



# **SEXING SPERMA UNTUK INDUSTRI PERBIBITAN SAPI**

Prof. Dr. Ir. Syahrudin Said, M.Agr.Sc., IPU., ASEAN Eng.  
Tulus Maulana, S.Pt., M.Si.

**ARHI AKADEMI 2022**



# **SEXING SPERMA UNTUK INDUSTRI PERBIBITAN SAPI**

## **PERTEMUAN 1.**

- PENGANTAR UMUM BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI

## **PERTEMUAN 2.**

- SISTIM REPRODUKSI JANTAN
- PERAN SPERMA DALAM MENENTUKAN KINERJA REPRODUKSI

## **PERTEMUAN 3.**

- MENGENAL TEKNOLOGI SEXING SPERMA
- METODOLOGI SEXING SPERMA
- VALIDASI SEXING SPERMA

## **PERTEMUAN 4.**

- TANTANGAN DAN PELUANG PENERAPAN SPERMA SEXING DALAM INDUSTRI PERBIBITAN NASIONAL



# **PENGANTAR UMUM BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI**



# PENGERTIAN BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI

## BIOTEKNOLOGI

CABANG ILMU BIOLOGI YANG MEMPELAJARI PEMANFAATAN MAKHLUK HIDUP (BAKTERI, FUNGI, VIRUS, DAN LAIN-LAIN) MAUPUN PRODUK DARI MAKHLUK HIDUP (ENZIM, ALKOHOL, ANTIBIOTIK, ASAM ORGANIK) DALAM PROSES PRODUKSI UNTUK MENGHASILKAN BARANG DAN JASA YANG DAPAT DIGUNAKAN OLEH MANUSIA (MERCK, 2005)

## REPRODUKSI

PROSES BIOLOGIS UNTUK MENGHASILKAN INDIVIDU BARU (GONNICK ET AL., 2006)

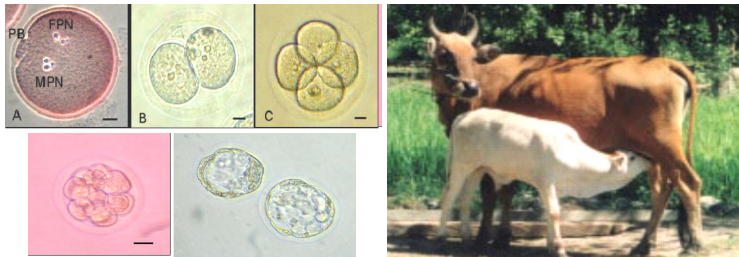
BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI ADALAH ILMU REPRODUKSI ATAU ILMU TENTANG PERKEMBANGBIAKAN YANG MENGGUNAKAN PERALATAN SERTA PROSEDUR TERTENTU UNTUK MENGHASILKAN SUATU PRODUK



# PERKEMBANGAN BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI

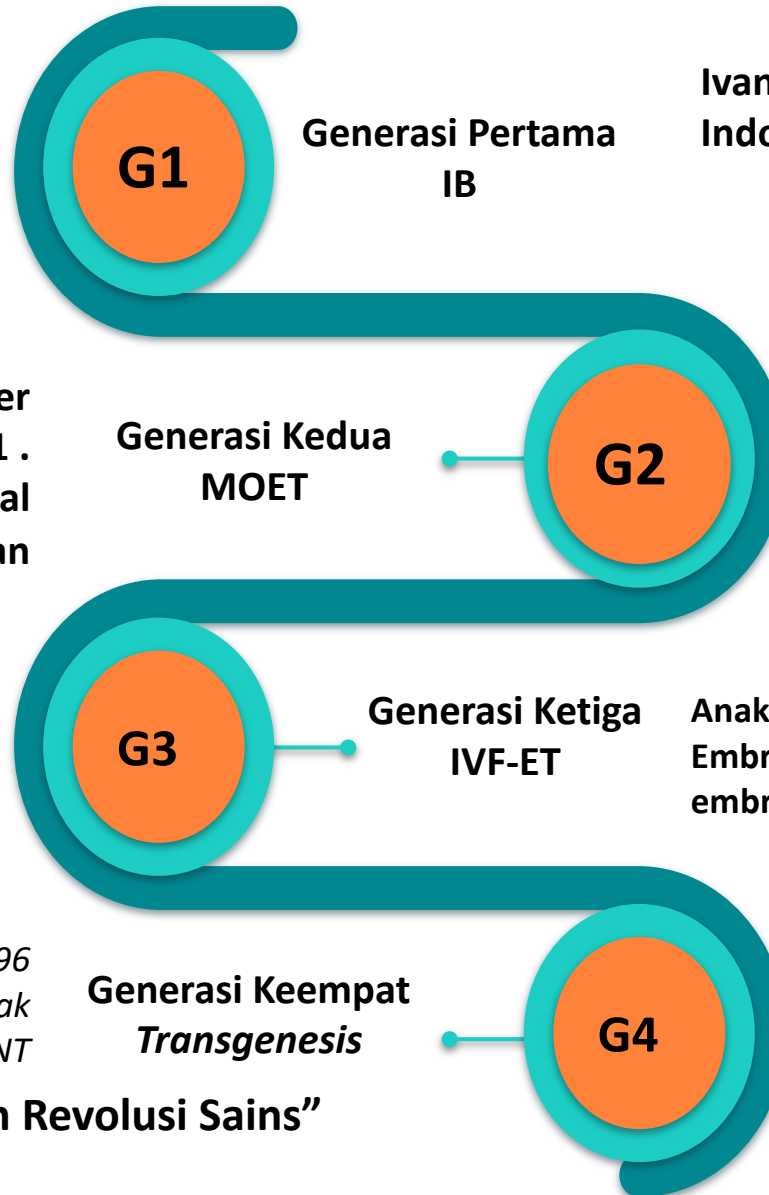


Sapi pertama hasil embrio transfer dilaporkan pada tahun 1951. TE diperkenalkan di Indonesia sejak awal dasawarsa 1980-an

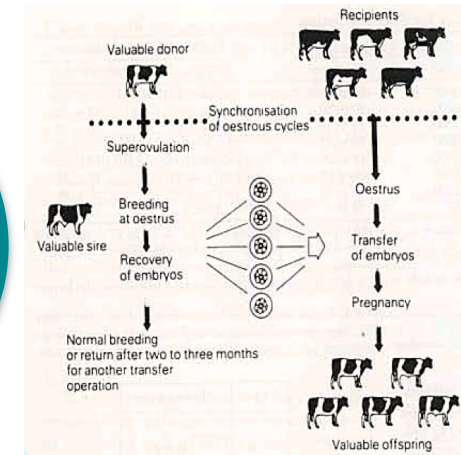


"Dolly" seekor domba lahir pada tahun 1996 merupakan kelahiran pertama ternak menggunakan teknik SCNT

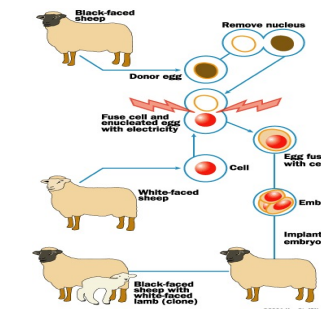
**"Perkembangan Revolusi Sains"**



Ivanoff (Rusia) 1899 & Ishikawa (Jepang) 1912  
Indonesia oleh Prof B Seith (Denmark) 1953



Anak sapi pertama hasil IVF lahir 1981. Embrio in vitro diproduksi melampaui jumlah embrio in vivo (2016)





**G1  
GENERASI 1**

**INSEMINASI BUATAN  
(IB)**

**Ivanoff (Rusia) 1899 & Ishikawa (Jepang) 1912  
Indonesia oleh Prof B Seith (Denmark) 1953**

**Populer  
1972**

1. Menghindari penyebaran penyakit reproduksi
2. Efisiensi penggunaan pejantan
3. Perbaikan mutu genetic ternak



Sinkronisasi berahi dan IB pada 250 ekor sapi, lahir 230 ekor, dengan s/c = 1.68, dan tingkat kesesuaian jenis kelamin anak 94.351% (Said et al., 2015)

**SPERM SEXING**

1. Memproduksi anak sesuai jenis kelamin yang diinginkan (jantan atau betina).
2. Strategis untuk pembibitan sapi perah (pilih betina) dan sapi potong (pilih jantan).
3. Menentukan komposisi jantan betina dalam suatu populasi

Johnson et al., 1989

**IB Sexing di Indonesia Tahun 2002**



**Jawa Barat**



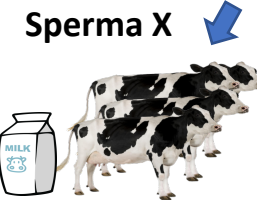
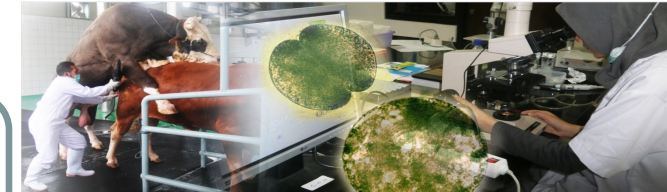
**Sumatera Barat**



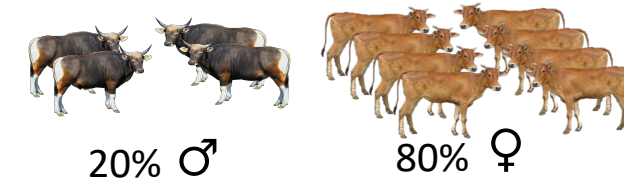
**Sulawesi Selatan**



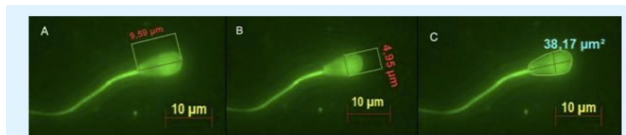
**Nusa Tenggara Barat**



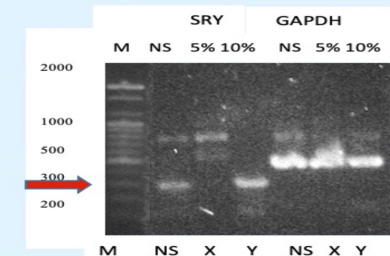
**STRUKTUR POPULASI**



**Validasi Sperm sexing**



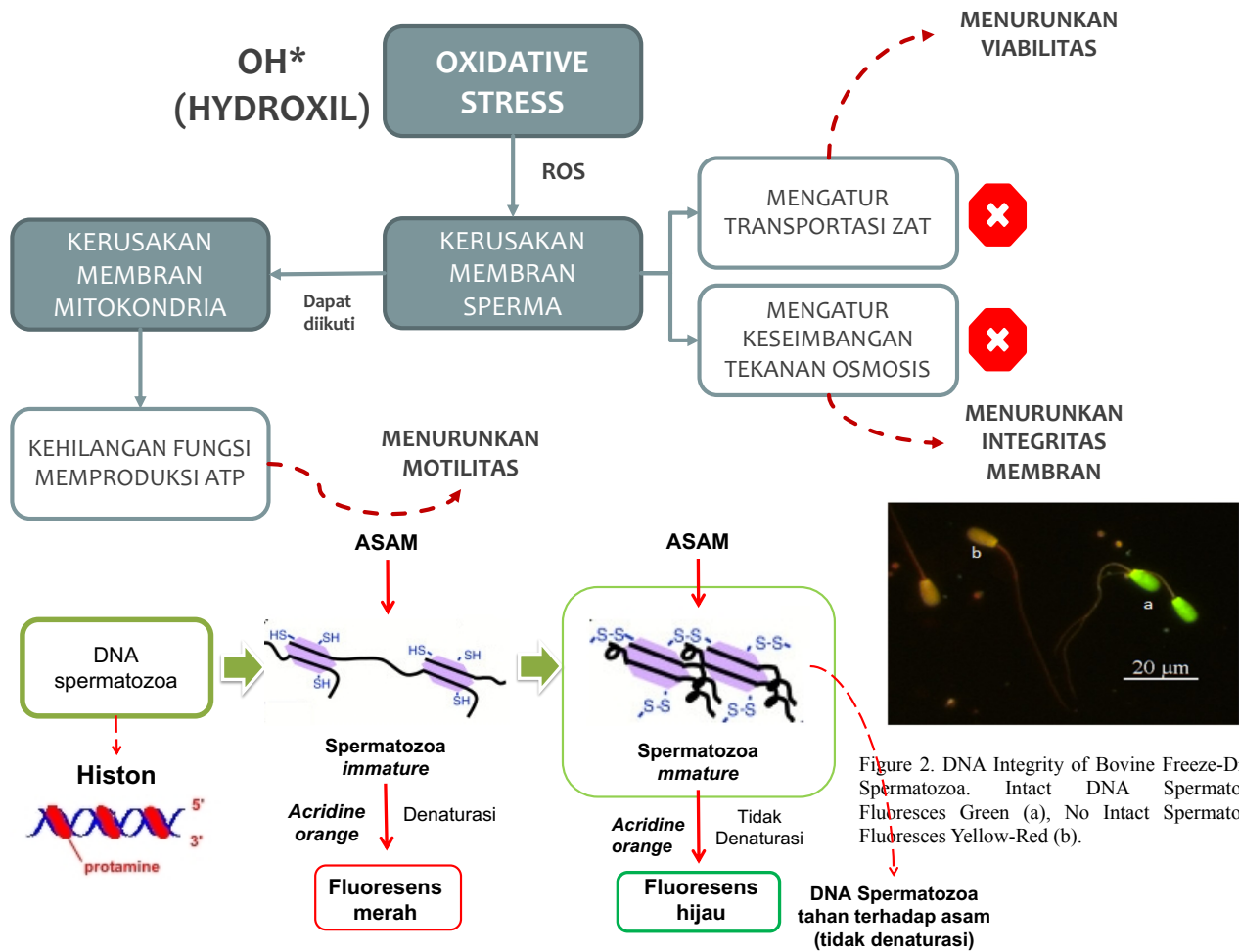
Sperma X dan Y mempunyai ukuran yang berbeda (Kaiin et al., 2017 a)



**Marker SRY terekspresi pada kolom 10% (Y) dan NS**

Kaiin et al., 2017 b; Kaiin et al. 2017c  
PATEN : IDP000074447 (2021)

# KRIOPRESERVASI SPERMATOZOA



**Table 2.** Effect of different concentrations of selected amino acids on characteristics of SO bull spermatozoa post thawing (Mean ± SE)

| Treatment | Semen Characteristics |                             |                    |
|-----------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
|           | Motility              | Viability                   | Membrane Integrity |
| Control   | 47.38±0.44            | 51.02±0.63                  | 52.67 ± 0.79       |
| Glycine   | 5 mM                  | 49.51 ± 0.61 <sup>a</sup>   | 52.85 ± 0.35       |
|           | 15 mM                 | 52.53 ± 1.68 <sup>b*</sup>  | 54.50 ± 1.37*      |
|           | 25 mM                 | 50.35 ± 1.18 <sup>ab*</sup> | 53.75 ± 1.66*      |
| Glutamine | 5 mM                  | 49.60 ± 2.18 <sup>a</sup>   | 53.58 ± 0.80*      |
|           | 15 mM                 | 52.98 ± 1.43 <sup>b*</sup>  | 53.58 ± 1.15*      |
|           | 25 mM                 | 50.87 ± 1.22 <sup>ab*</sup> | 53.16 ± 1.63       |
| Cysteine  | 3 mM                  | 47.50 ± 1.22 <sup>a</sup>   | 52.83 ± 2.04       |
|           | 5 mM                  | 51.00 ± 2.19 <sup>b*</sup>  | 55.00 ± 1.26*      |
|           | 7 mM                  | 48.66 ± 0.81 <sup>ab</sup>  | 52.83 ± 0.75       |

Within each amino acid, means with different alphabetical superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). Within columns, (\*) indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) of a given element from control.

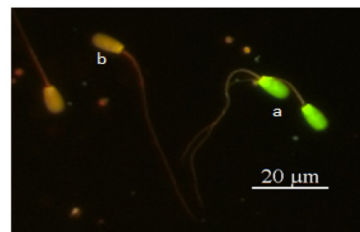
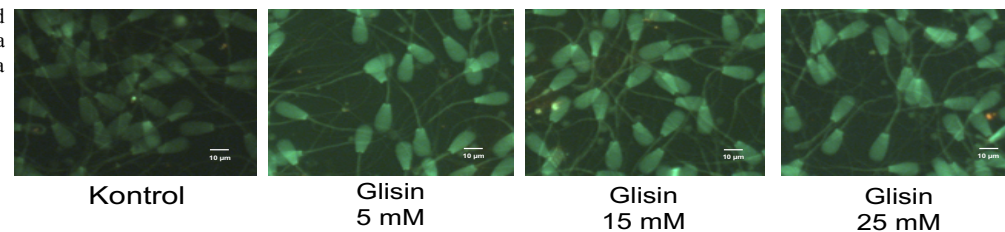


Figure 2. DNA Integrity of Bovine Freeze-Dried Spermatozoa. Intact DNA Spermatozoa Fluoresces Green (a), No Intact Spermatozoa Fluoresces Yellow-Red (b).





# Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET)

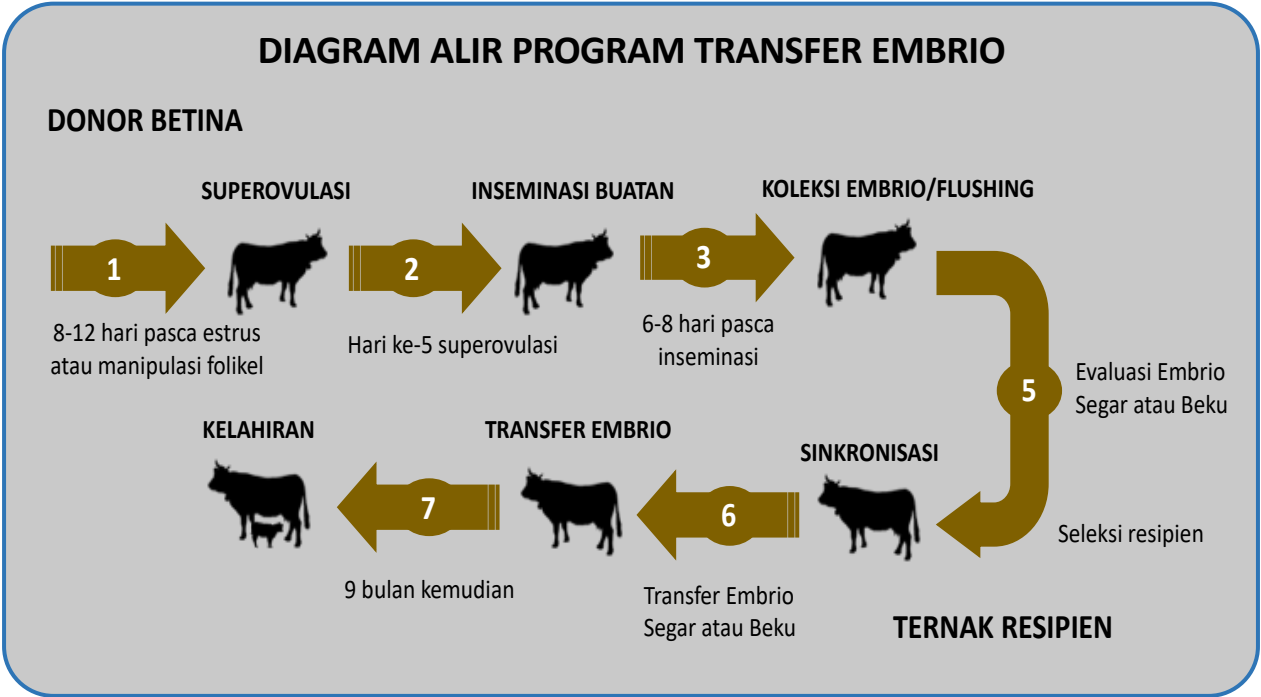
1. Meningkatkan mutu genetic secara cepat, berupa pemanfaatan bibit unggul dari kedua tetuanya.
2. Meningkatkan perolehan sel telur selama estrus dan difertilisasi dengan bantuan IB.
3. Peningkatan nilai genetic untuk produksi susu, daging, wool, bulu, dll.

**Sapi pertama hasil embrio transfer dilaporkan pada tahun 1951**

**TE diperkenalkan di Indonesia sejak awal dasawarsa 1980-an**



Produksi kembar dengan kombinasi IB dan TE, menghasilkan kebuntingan (42,86%) dan kelahiran kembar (16,67%) (Said *et al.*, 2009)



## In Vitro Fertilisasi (IVF)

1. Pembuahan dilakukan diluar tubuh ternak
2. IVF digunakan untuk mengatasi masalah tidak respon terhadap superovulasi pada ternak betina, masalah infertilitas pada ternak jantan dan atau betina
3. Teknologi IVF mampu menghasilkan embrio dalam jumlah masal dengan memanfaatkan sel telur dari ovarium ternak hidup atau dari rumah potong hewan (RPH)

**ADULT COWS**

NO RESPONSE OF SUPEROVULATION

FACTOR INFERTILITY

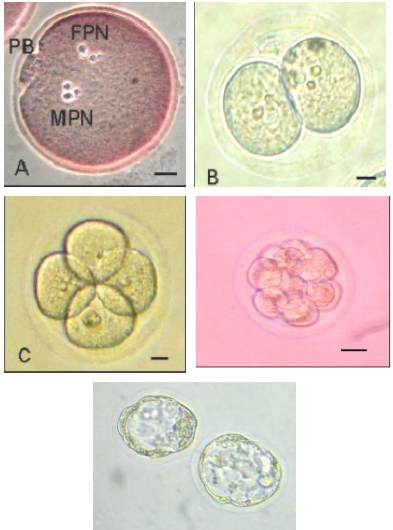
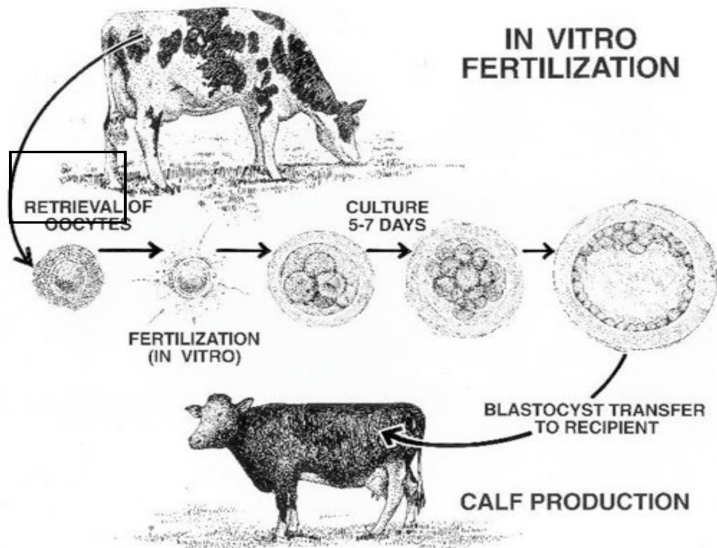
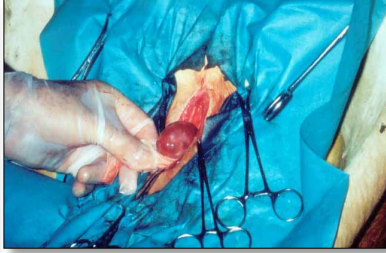
LACTATION WITHOUT OESTRUS

**PREPUBERTAL HEIFERS**

SHORTENING GENERATION INTERVAL

PROGENY TEST

TRANSGENESIS, ECT



**Table 4.3.** Calves after OPU and superovulation (adapted from Bousquet *et al.*, 2003).

|                               | In vitro embryos |                     | Conventional embryos |
|-------------------------------|------------------|---------------------|----------------------|
|                               | Adult cows       | Prepubertal heifers | Superovulated donors |
| Frequency of collections      | 4/60 days        | 4/60 days           | 1/60 days            |
| Collections/year              | 24               | 24                  | 6                    |
| No. transferable embryos/year | 96               | 48                  | 24                   |
| Pregnancy rate                | 53%              | 53%                 | 60%                  |
| Number of calves              | 50               | 25                  | 14                   |

IVF CONVENTIONAL

SEL TELUR DARI RPH. KETERSEDIAAN SEL TELUR MENJADI PEMBATAS

SOLUSI

TRANSVAGINAL OOCYTE RETRIEVAL (TVOR) AND OOCYTE PICK UP (OPU)

OPU-IVEP

DIGUNAKAN PADA BEBERAPA NEGARA UNTUK PRODUKSI EMBRIO KOMERSIL

KOLEKSI SEL TELUR BERULANG UNTUK PRODUKSI EMBRIO DAN PELAKSANAAN ET  
(Galli and Lazzari, 2008)

KOLEKSI OOSIT DARI TERNAK LANGKA DAN TERNAK YANG MEMILIKI NILAI  
EKONOMI TINGGI

MASALAH IVEP

BIAYA TINGGI, DAN EFISIENSINYA MASIH RENDAH

## KELAHIRAN ANAK SAPI HASIL TRANSFER EMBRIO-IVF-SEXED

| DONOR IVF EMBRYOS |   |                  | NO | RECIPIENTS | X/Y EMBRYOS    | PREGNANT | NOTE                    |
|-------------------|---|------------------|----|------------|----------------|----------|-------------------------|
| Oocytes           | : | Brahman Cross    | 1  | Waderi 1   | X - Morulae    | Negative |                         |
| Sperm             | : | PO Sexed         | 2  | Waderi 2   | X - Morulae    | Negative |                         |
| Produced          | : | 23 April 2003    | 3  | Teguh      | Y - Morulae    | Positive | Born Oct 1, 2004        |
| RECIPIENTS        |   |                  | 4  | Mansuri    | Y - Blastocyst | Negative |                         |
| Breed             | : | Bali Cows        | 5  | Tukidi     | Y - Morulae    | Positive | Sold, Pregnant 7 months |
| ET                | : | 17 December 2003 | 6  | Sunarko    | Y - Blastocyst | Negative |                         |



KELAHIRAN PERTAMA DI INDONESIA

Dengan bantuan teknologi transfer embrio, sapi dapat diproduksi secara massal dengan jenis kelamin sesuai harapan (Said *et al.*, 2005)

### HASIL IVF PERTAMA

Manusia (1978) ;  
Sapi (1981);  
Kerbau (1990)

Gebrehiwot *et al.*, 2013.

Produksi embrio sapi per tahun :  
*In Vivo* : 750.000 embrio  
IVF : 450.000 embrio

Embrio *in vitro* diproduksi melampaui jumlah embrio *in vivo* (2016)

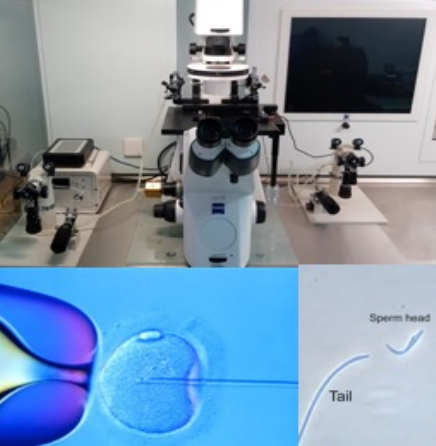
### Hasil *In Vitro* Production

- IVM : 70-90%
- IVF : 60-70%
- Pembelahan sel: 40-50%
- Blastosis: 15-30%
- Lahir : 10,5%

Nandi *et al.*, 2002

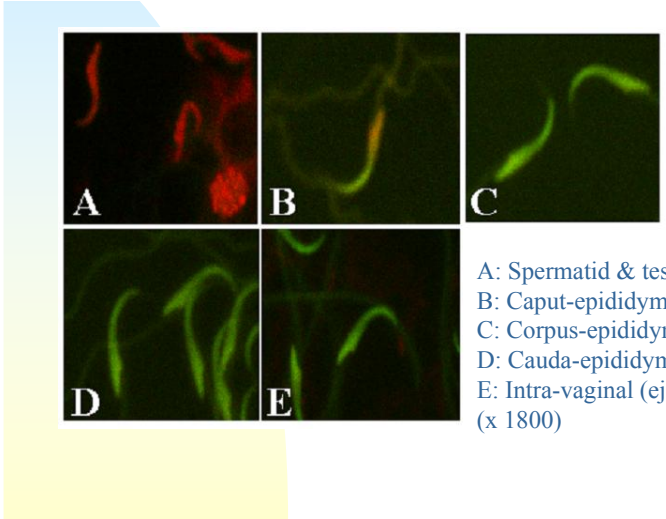
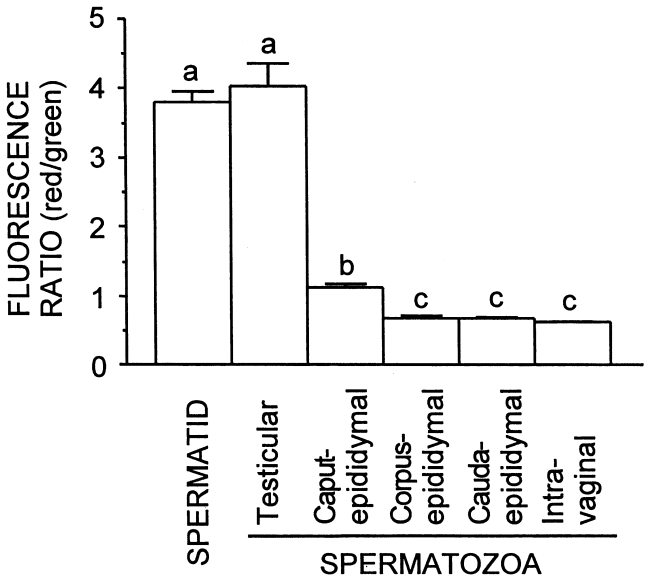
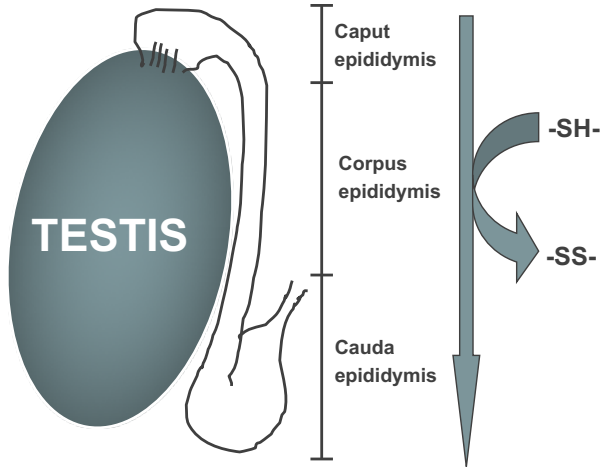


# INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)



- MASALAH INFERTILITAS
- TUJUAN PENELITIAN (SPERM DECONDENSATION, PN, SMGT)
- KONSERVASI (FREEZE DRIED SPERM), GERMLASM
- TERNAK TERANCAM PUNAH, PELIHARAAN

## ICSI dan STABILITAS INTI SPERMA



A: Spermatid & testicular spermatozoa  
 B: Caput-epididymal spermatozoon  
 C: Corpus-epididymal spermatozoa  
 D: Cauda-epididymal spermatozoa  
 E: Intra-vaginal (ejaculated) spermatozoa (x 1800)

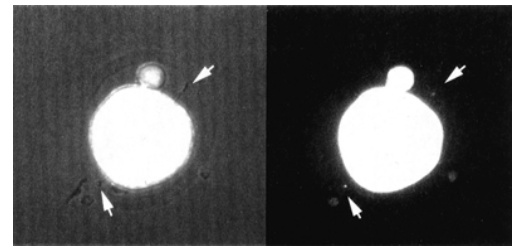
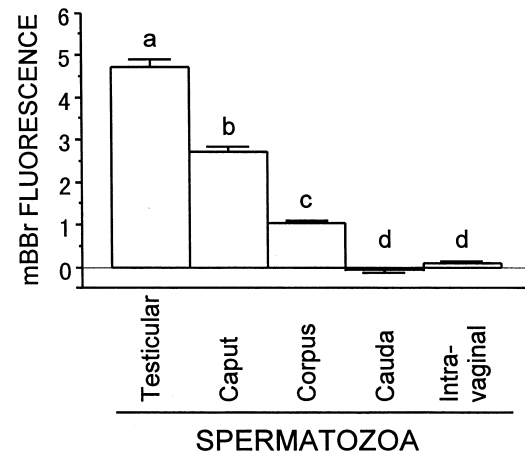
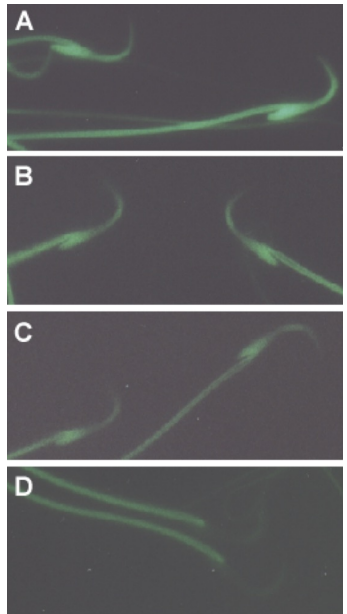


Figure 5 Monobromobimane (mBBr) fluorescence of rat sperm nuclei in the perivitelline space (arrows).



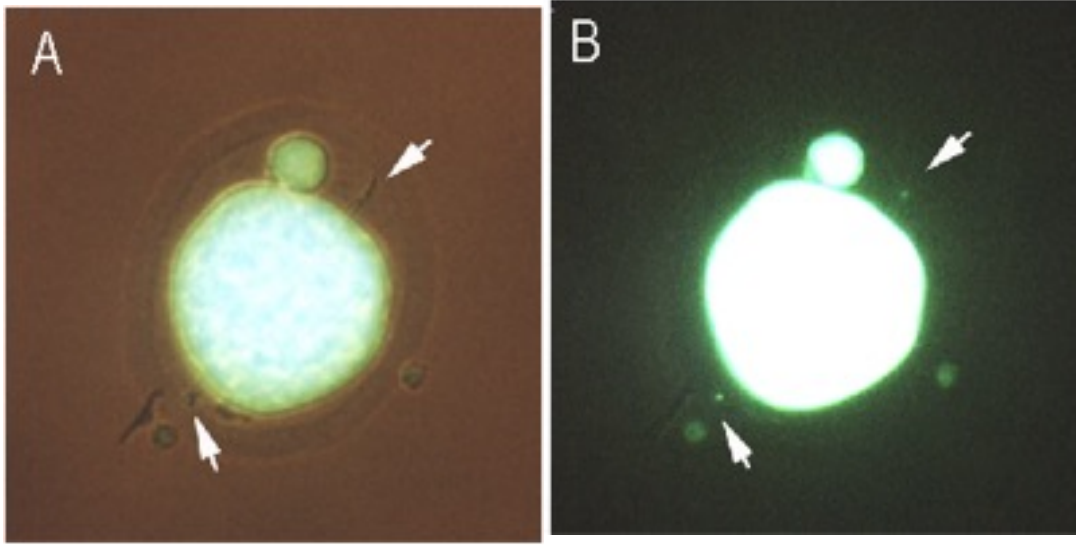
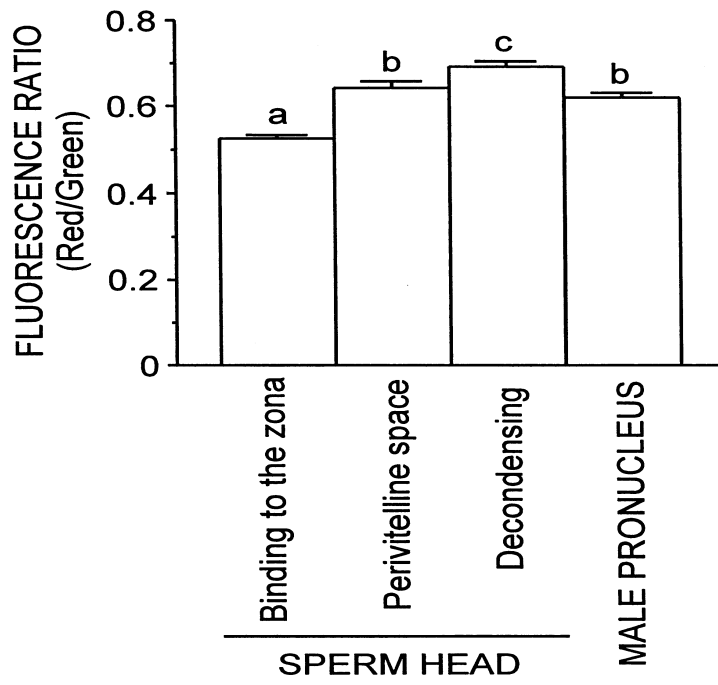
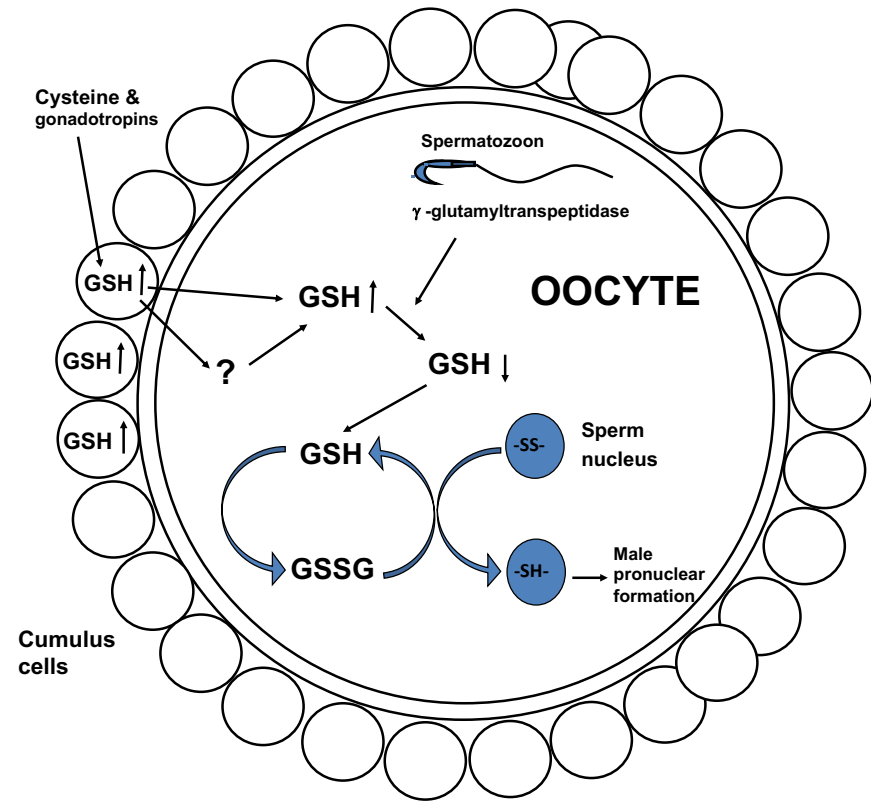
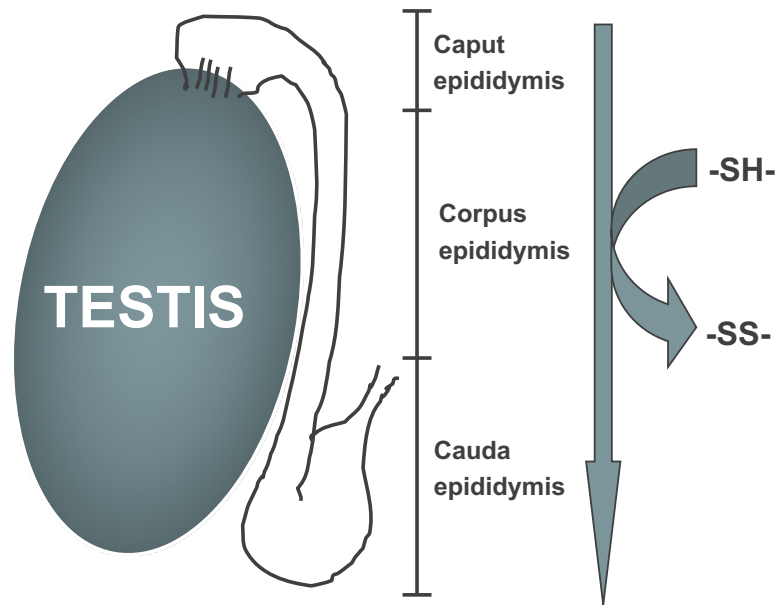


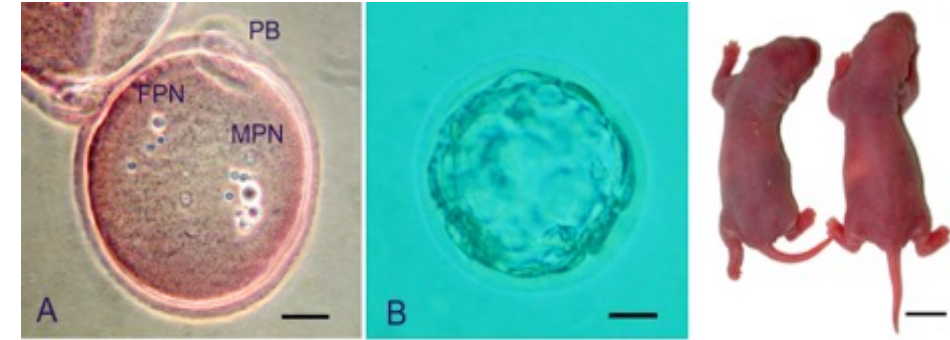
Table 4. *In vivo* development of rat 1-cell embryos produced by piezo-injection of sperm heads.

| Spermatozoa from | Recipients conceived/transferred, n (%) | Embryos transferred, n | Implantation site, n (%) | Young born n <sup>1</sup> (%) |
|------------------|---|------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Testes           | 3/14 (21) <sup>a</sup>                  | 179                    | 14 (8) <sup>a</sup>      | 1 + 2 <sup>2</sup> = 3 (2)    |
| Caput epididymal | 5/13 (38) <sup>b</sup>                  | 185                    | 39 (21) <sup>b</sup>     | 4 <sup>2</sup> + 3 = 7 (4)    |
| Cauda epididymal | 3/12 (25) <sup>ab</sup>                 | 153                    | 33 (22) <sup>b</sup>     | 3 + 3 = 6 (4)                 |

<sup>1</sup>Number of females + males = total number of young.

<sup>2</sup>Including 1 dead young.

<sup>a,b</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different (P<0.05).



## ICSI Menggunakan Freeze Dried Spermatozoa

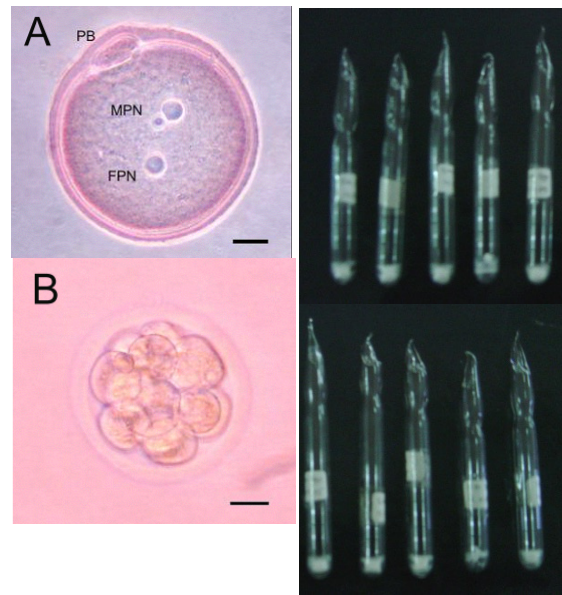
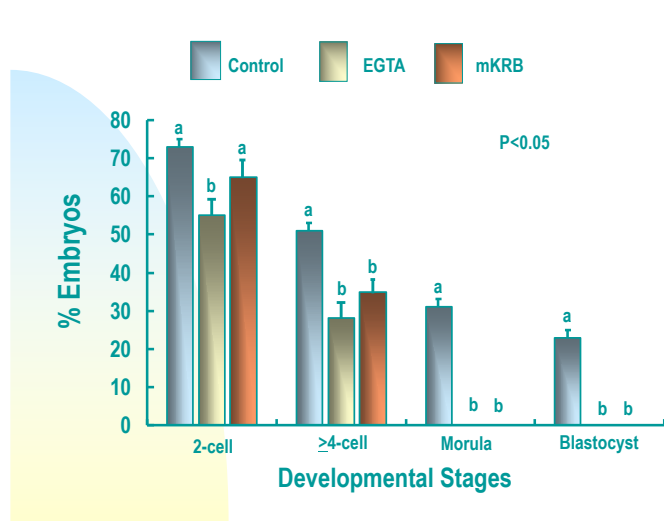


Table 3. DNA Integrity of Freeze-dried Bovine Spermatozoa using Acridine Orange Method

| Treatments            | DNA Integrity (%)         |                         |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
|                       | Intact                    | No intact               |
| Fresh Sperm 0H        | 500 (100.00) <sup>a</sup> | 0 (0.00) <sup>a</sup>   |
| Fresh Sperm 3H        | 500 (100.00) <sup>a</sup> | 0 (0.00) <sup>a</sup>   |
| Fresh Sperm 6H        | 500 (100.00) <sup>a</sup> | 0 (0.00) <sup>a</sup>   |
| Freeze-dried Sperm 0H | 488 (97.67) <sup>a</sup>  | 12 (2.33) <sup>a</sup>  |
| Freeze-dried Sperm 3H | 499 (99.83) <sup>a</sup>  | 1 (0.17) <sup>a</sup>   |
| Freeze-dried Sperm 6H | 430 (86.00) <sup>b</sup>  | 70 (14.00) <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup> = different superscripts in the same column indicated significantly different (P<0.05)

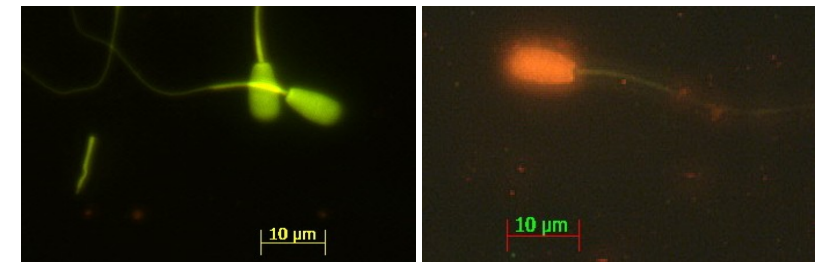
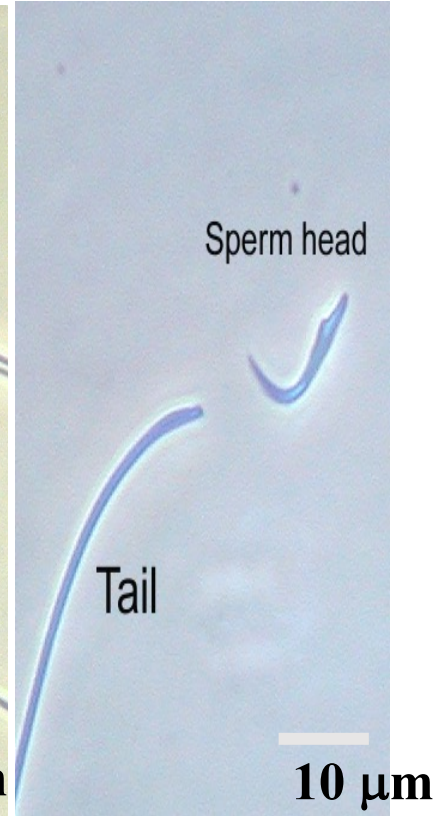
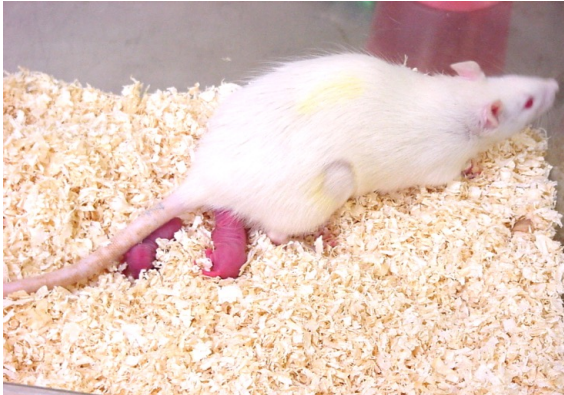
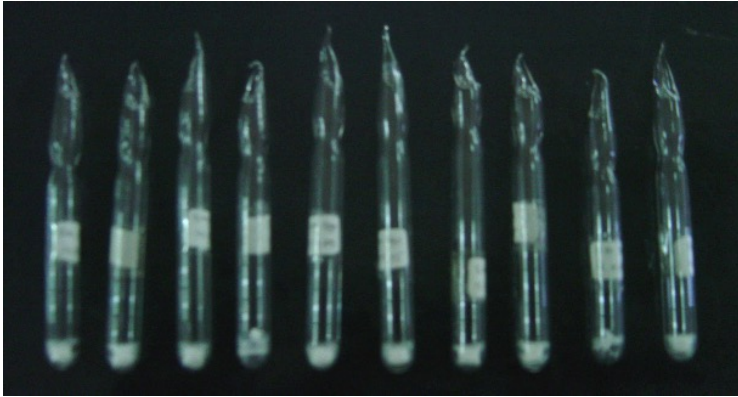


Figure 1. Changes the DNA Integrity of Bovine Fresh Spermatozoa. Double-stranded DNA Fluoresces Green  
 Figure 2. Changes of the DNA Integrity of Bovine Freeze-dried Spermatozoa. Single-stranded DNA Fluoresces Red



# ICSI USING FREEZE-DRIED SPERMATOZOA



# INTRA CYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)

## ICSI

BERHASIL DITERAPKAN PADA FAKTOR INFERTILITAS MANUSIA, JUGA BISA DITERAPKAN PADA TERNAK UNTUK PRODUKSI TERNAK TRANSGENIK (SMGT) DAN UNTUK MEMPELAJARI MEKANISME FERTILISASI

KEBERHASILAN ICSI : 70- 80% IN CATTLE (HORIUCHI ET AL., 2002), 77% IN PIG (MARTIN, 2000), AND 48-63% IN SMALL RUMINANTS (CATT ET AL., 1996). IN HORSES, IVF PROVED TO BE VERY COMPLICATED AND PROBLEMS-BEARING PROCEDURE. THUS, INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) TECHNIQUE IS PREFERABLY USED FOR THIS SPECIES (COLLEONI ET AL. 2007). ICSI PADA TIKUS SULIT MENCAPAI BLASTOSIS, TETAPI EMBRIO TAHAP PRONUCLEUS DAN 2 SEL DITRANSFER KE RESIPIEN BERHASIL LAHIR (SAID ET AL., 2003)

## IVF VS ICSI

TINGKAT FERTILISASI : ICSI LEBIH TINGGI DARIPADA IVF  
TINGKAT KEBUNTINGAN : ICSI LEBIH RENDAH 20%.

# IVM/IVF EMBRYO PRODUCTION

TEKNOLOGI PRODUKSI EMBRIO IN VITRO TIDAK HANYA MEMBANTU MENGHASILKAN HEWAN DENGAN GENETIC UNGGUL, TETAPI JUGA SEBAGAI PENYEDIA EMBRIO YANG SANGAT BAIK UNTUK PENERAPAN BIOTEKNOLOGI SEPERTI EMBRIO SEXING, CLONING, NUCLEAR TRANSFER DLL. LEBIH LANJUT, MEMUNGKINKAN UNTUK MENGANALISIS POTENSI PERKEMBANGAN EMBRIO, TERMASUK POLA EKSPRESI GEN, MODIFIKASI EPIGENETIK DAN GANGGUAN CYTOGENETIK SELAMA PERKEMBANGAN (GALLI AND LAZZARI, 2008).



1. **PRODUKSI TERNAK DENGAN GENETIC UNGGUL**
2. **SUMBER EMBRIO UNGGUL : EMBRIO SEXING, CLONING, NUCLEAR TRANSFER, TRANSGENESIS, DLL**
3. **POTENSI ANALISIS EMBRIO : EKSPRESI GEN, EPIGENETIK, CYTOGENETIC DISORDER**

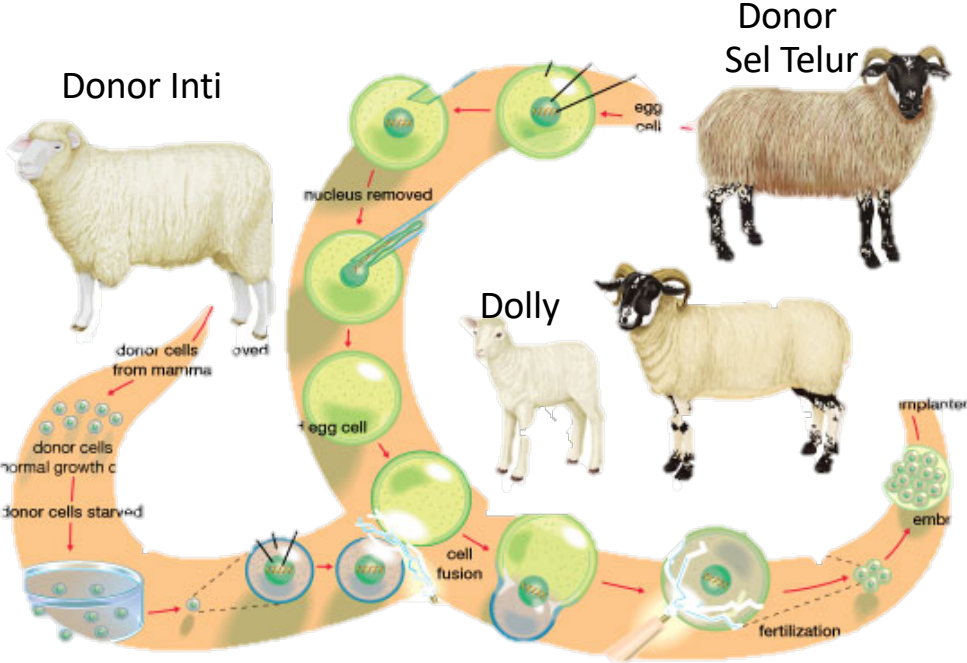
**EFISIENSI EMBRIO IVP : 30-40% MENCAPAI BLASTOSIS (Sirad *et al.*, 2006)**

**G4**  
**GENERASI 4**

**TRANSGENESIS**

**“Perkembangan Revolusi Sains”**

**TEKNIK KLONING DOLLY**



**“Dolly” seekor domba lahir pada tahun 1996 merupakan kelahiran pertama ternak menggunakan teknik SCNT**

**KLONING ???**

- **BIOLOGI MOLEKULAR** : Proses membuat salinan DNA
- **BIOLOGI SEL** : Propagasi sel progenitor untuk mendapatkan populasi sel bergenetik sama
- **BIOLOGI HEWAN** : Produksi Salinan genetic individu hewan dengan transfer inti.

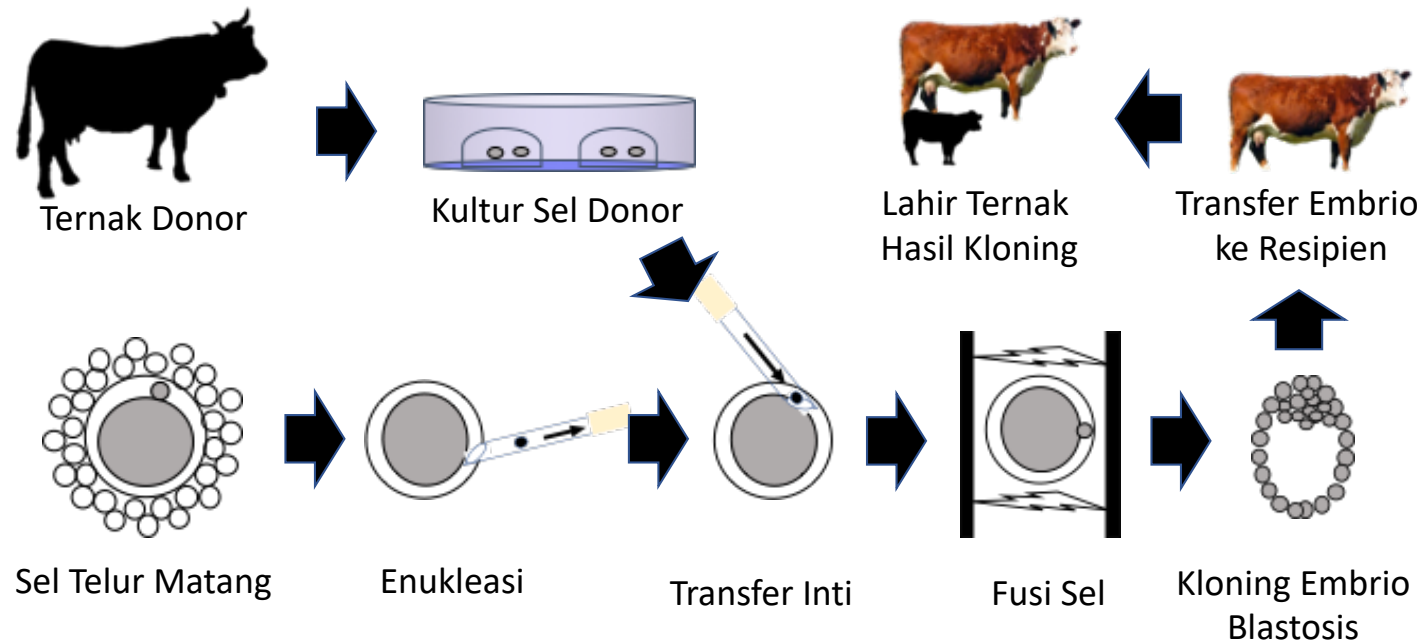
**KLONING SEL SOMATIK**

**Ternak Unggul**

**Xeno-Transplantasi**

**Ternak Transgenik**

**Menyelamatkan Hewan Punah**



**Gambar 6.5**

Skema pelaksanaan SCNT

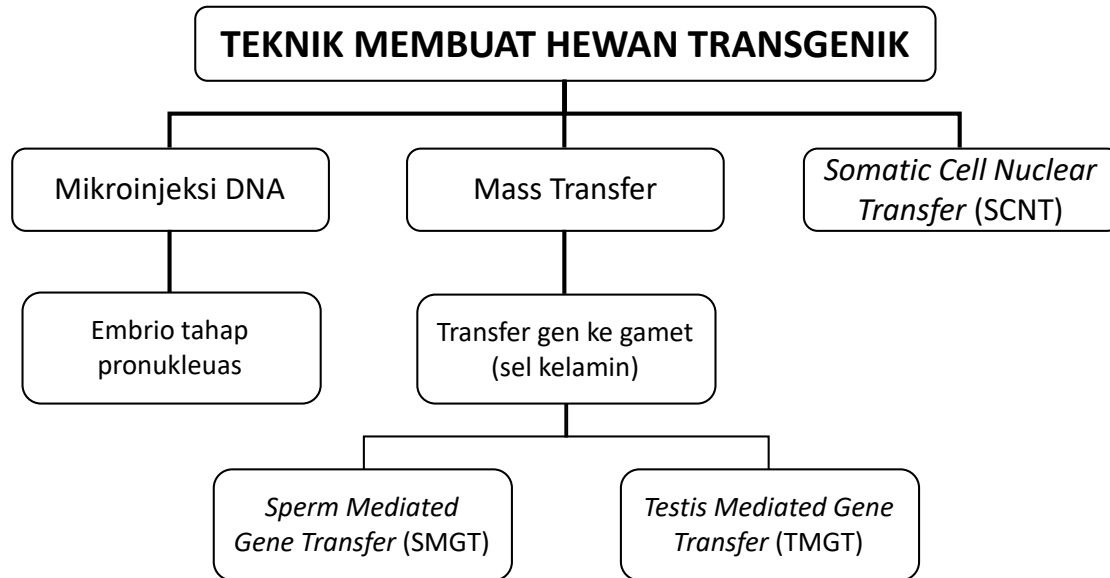
| Spesies | Efisiensi                 |                         |
|---------|---------------------------|-------------------------|
|         | Rekonstruksi Sel Telur, % | Transfer Embrio SCNT, % |
| Sapi    | 1,7                       | 11,5                    |
| Domba   | 6                         | 6                       |
| Kuda    | 0,8                       | 19                      |
| Babi    | 0,3                       | 5-13                    |
| Kambing | 0,3                       | 3,4-5,9                 |

Tabel 6.1

Efisiensi Kloning pada beberapa ternak

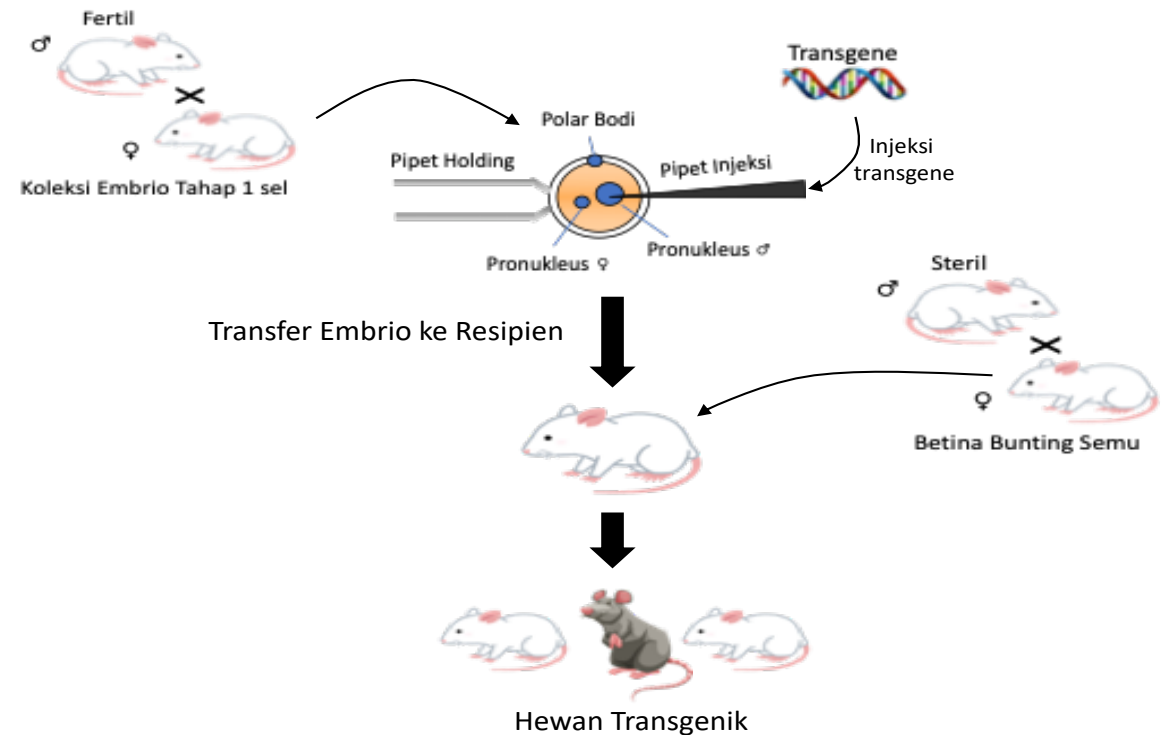


# HEWAN TRANSGENIK



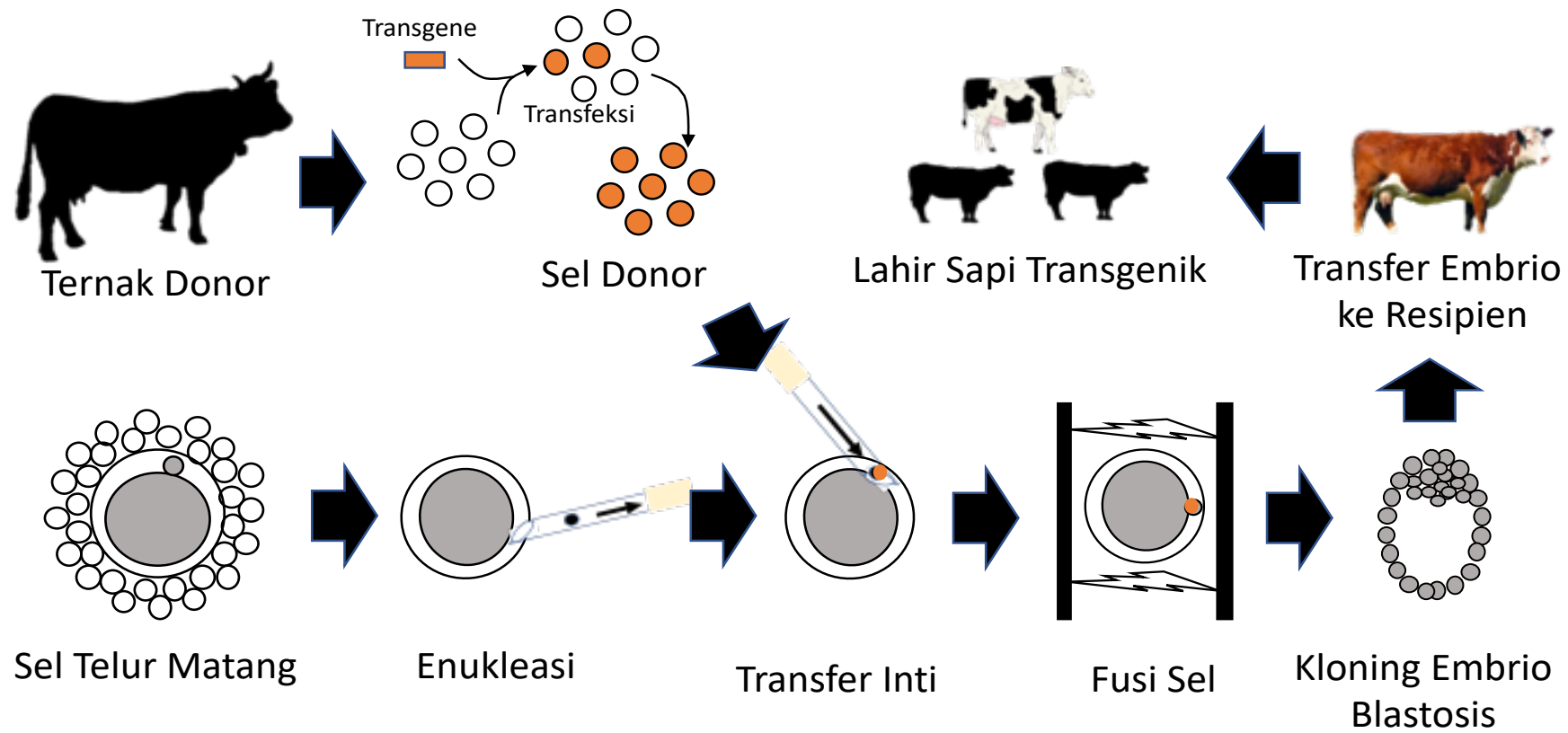
**Gambar 7.1** Teknik utama membuat hewan transgenik

**Transgenesis** meliputi introduksi sekuens DNA asing kedalam genom organisme multisel, dan memastikan bahwa sekuens tersebut ditransmisikan ke keturunan spesies yang dimanipulasi.



**Gambar 7.2** Ilustrasi membuat hewan transgenik dengan teknik mikro injeksi



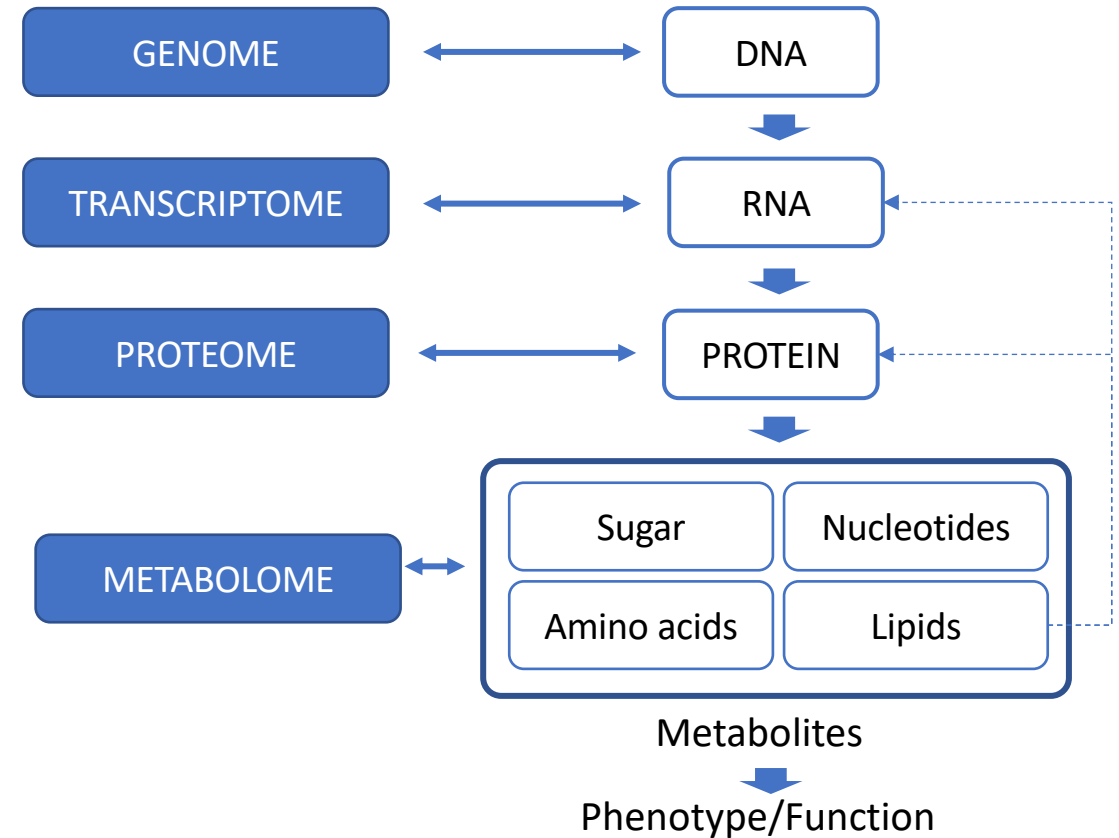


**Gambar 7.3** Ilustrasi membuat hewan transgenik dengan teknik SCNT

G5  
GENERASI 5

**"OMICS" ??**

- FERTILITAS PEJANTAN BERPERAN SANGAT PENTING UNTUK EFISIENSI DAN KEBERLANJUTAN USAHA PETERNAKAN.
- FUNGSIONAL GENOME PADA SPERMA DAN PLASMA SEMINAL TERMASUK METABOLOME SANGAT KRUSIAL UNTUK FUNDAMENTAL SAINS BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI.
- SPERMA DAN PLASMA SEMINAL MENGANDUNG BERAGAM METABOLIT
- MEMVALIDASI METABOLIT TERSEBUT DAPAT DIGUNAKAN UNTUK PENANDA FERTILITAS



# SELEKSI KESUBURAN PEJANTAN (DAYA FERTILITAS)

## BIOTEKNOLOGI MAJU

## KONVENSIONAL

- *Non Return Rate (NRR)*
- *Breeding Soundness Evaluation (BSE)*

**Sub Fertil !!!**

Ribuan ejakulasi, kriopreservasi, IB

**Biaya Besar**

Sub fertile mengakibatkan kerugian besar pada usaha pembibitan ternak (Bhasin, 2007; Ferlin *et al.*, 2006; Lopez-Gatius, 2003; Lucy, 2001)

**Analisa Semen** (Makro & Mikro)

**Pengamatan Fisik**  
(Genetalia : palpasi rektal)

**Lingkar Scrotum & libido**  
(Pengukuran scrotum dan tingkah laku seksual)

**Transkriptomik  
Spermatozoa**

**Proteomik  
Spermatozoa**

**RNA SPERMATOZOA**

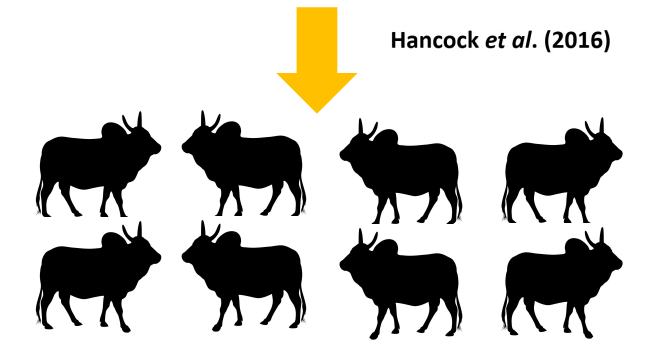
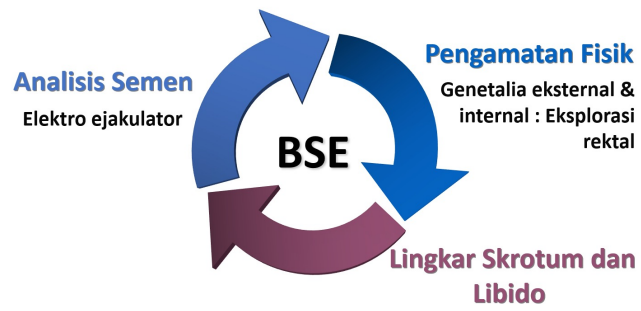
**PROTEIN SPERMATOZOA**

- Fertilisasi,
- Perkembangan embrio,
- Aktivasi genom embrio,
- Ekspresi gen tetua ♂

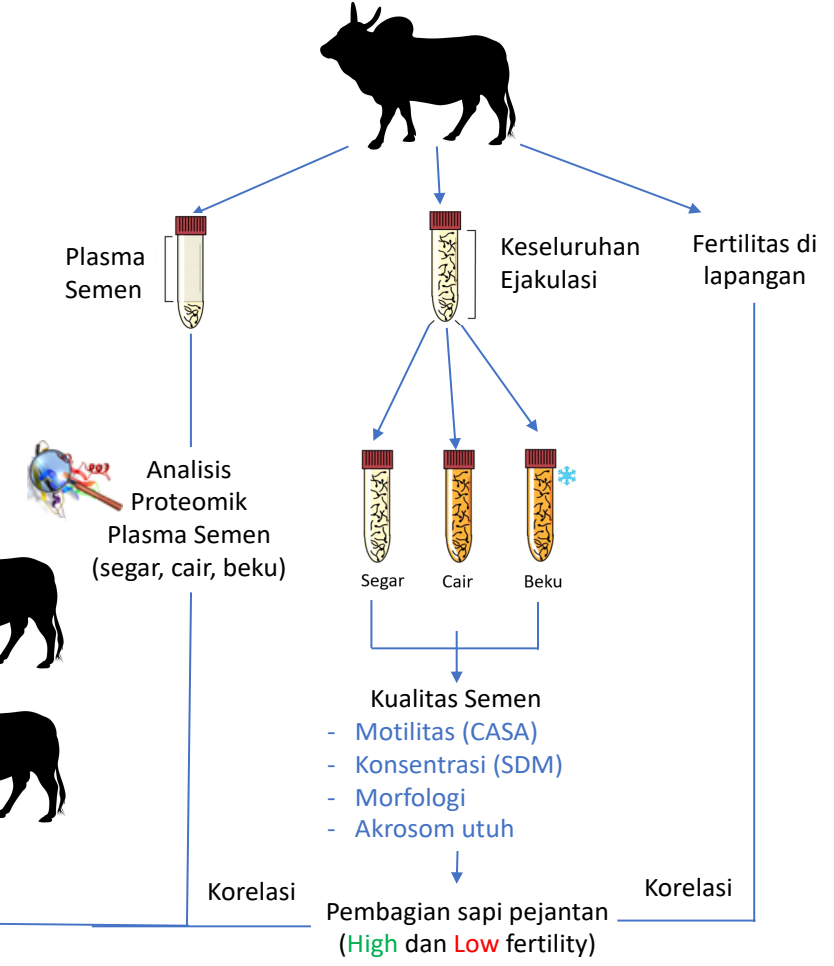
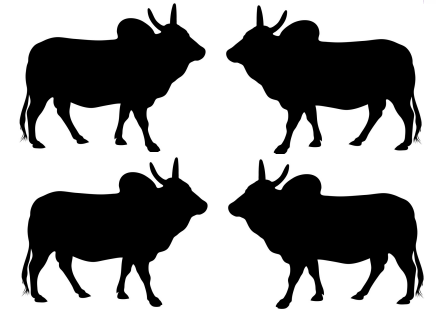
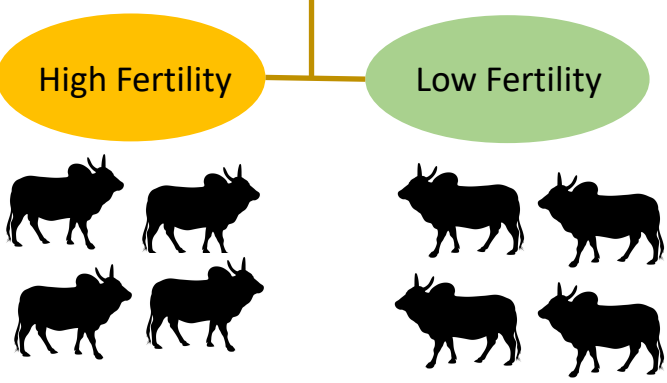
**Protein spesifik  
biomarker fertilitas**

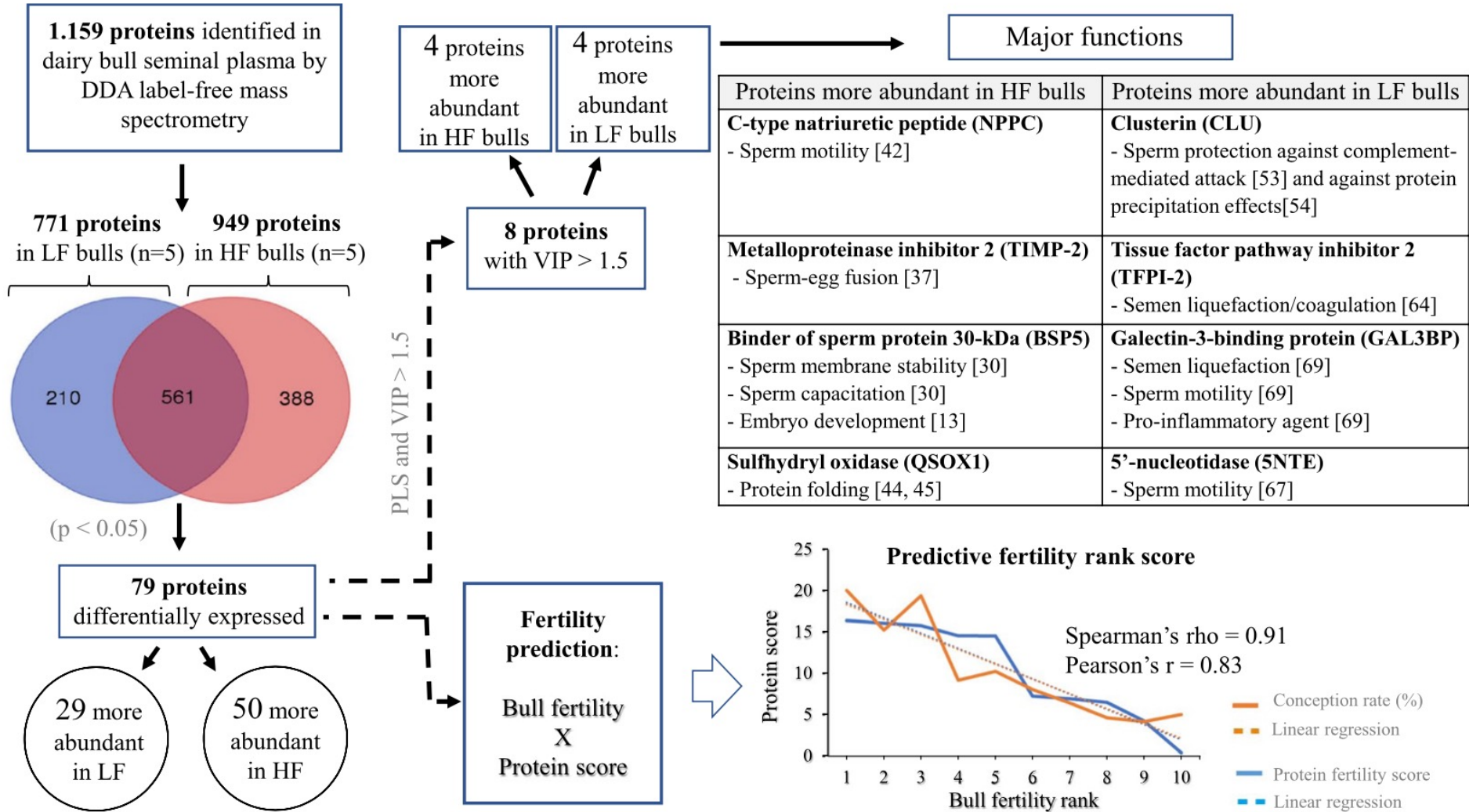
**DIAGNOSTIK INFERTILITAS  
DAN KUALITAS SEMEN**

# PROTEOMIK PLASMA SEMEN DALAM UPAYA PRODUKSI/SELEKSI PEJANTAN BERDAYA FERTILITAS TINGGI



**Belum menjamin memiliki Fertilitas Tinggi**





# Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility

Viana *et al.*, 2018

**Figure 7.** A graphical abstract showing the main findings of this study. Using DDA label-free mass spectrometry, 1,159 proteins were identified in dairy bull seminal plasma. Of the 1,159 proteins, 949 were found in seminal plasma from high fertility (HF, n = 5) bulls and 771 proteins in low fertility (LF, n = 5) sires, while 561 proteins were common to both HF and LF phenotypes. There were 50 and 29 seminal proteins more abundant in HF and LF bulls, respectively. Based on multivariate analyses, there were eight proteins with VIP score greater than 1.5 (Fig. 4b), indicating meaningful contributions of such proteins for definition of the fertility phenotype. Among them, four proteins were more abundant in either HF or LF bulls. DDA: dependent data acquired; PLS: partial least square; VIP: variable influence in projection.

**TERIMA KASIH**