

VERIFIKASI MOLEKULER SEXING SEMEN SAPI LIMOUSIN METODE SENTRIFUGASI GRADIEN PERCOLL DENGAN *duplex* PCR & qPCR

Yemi Ulviani

19/449934/PMU/09940

Teknologi pemisahan jenis kelamin (*sexing spermatozoa*) memungkinkan menghasilkan jenis kelamin anakan sapi sesuai tujuan pemeliharaan sehingga dapat mengoptimalkan penerapan inseminasi buatan dalam pemenuhan kebutuhan daging sapi di Indonesia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas semen Sapi Limousin (*Bos taurus*) setelah *sexing* menggunakan *Gradien Densitas Percoll*, dan mengetahui evaluasi hasil verifikasi metode *sexing* menggunakan *duplex-Polymerase Chain Reaction (duplex-PCR)* dan *quantitative PCR (qPCR)*. Pemisahan spermatozoa jantan dan betina didasarkan pada berat molekul DNANYa, kromosom X (betina) mengandung 3,8% lebih banyak DNA daripada kromosom Y (jantan) pada sapi. Hasil penelitian diperoleh kualitas semen *sexing* untuk motilitas terbesar diperoleh pada sentrifugasi kecepatan 2300 rpm selama 5 menit sebesar 66,7 % \pm 5,7 untuk spermatozoa X & 38,3% \pm 5,7 untuk spermatozoa Y. Verifikasi molekuler dengan *duplex* PCR terverifikasi adanya 2 pita yaitu gen SRY (170 bp) untuk kromosom Y dan PLP1 (242 bp) untuk kromosom X. Hal ini menunjukkan bahwa pada gradien densitas percoll lapisan bawah terdapat lebih banyak sperma X sedangkan pada lapisan atas banyak mengandung sperma Y. Hasil evaluasi qPCR menunjukkan kurva leleh dengan satu peak untuk kromosom X dan Y pada suhu 80⁰C. Hasil ini berarti bahwa primer telah mengamplifikasi gen SRY dan PLP1 dengan tepat. Sehingga dapat disimpulkan *sexing spermatozoa* sapi limousin dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll dapat terverifikasi secara molekuler memisahkan sperma sapi pembawa kromosom X dan Y yang diuji dengan menggunakan metode *duplex* PCR dan qPCR.

Kata kunci : *sexing spermatozoa*, gradien densitas percoll, verifikasi molekuler, *duplex* PCR, qPCR

**MOLECULAR VERIFICATION SEXING OF LIMOUSIN *CATTLE* (*Bos taurus*)
PERCOLL'S DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION METHOD WITH duplex
PCR & qPCR**

Yemi Ulviani

19/449934/PMU/09940

The technology of sex segregation (sexing spermatozoa) allows the sex of calves to be produced according to the purpose of rearing so as to optimize the application of artificial insemination in meeting the demand for beef in Indonesia. The aims of this study were to determine the semen quality of Limousin Cattle (*Bos taurus*) after sexing using Percoll Density Gradients, and to evaluate the results of verification of the sexing method using duplex-Polymerase Chain Reaction (duplex-PCR) and quantitative PCR (qPCR). The separation of male and female spermatozoa is based on the molecular weight of their DNA, the X chromosome (female) contains 3.8% more DNA than the Y chromosome (male) in cattle. The results showed that the quality of sexing semen for the greatest motility was obtained at 2300 rpm centrifugation speed for 5 minutes at 66.7% \pm 5.7 for X spermatozoa & 38.3% \pm 5.7 for Y spermatozoa. Molecular verification with duplex PCR verified the presence of 2 bands, namely the SRY gene (170 bp) for the Y chromosome and PLP1 (242 bp) for the X chromosome. This indicates that the lower layer percoll density gradient contains more X sperm while the upper layer contains more Y sperm. The qPCR evaluation results show melting curve with one peak for the X and Y chromosomes at 800C. This result means that the primer has amplified the SRY and PLP1 genes appropriately. So it can be concluded that sexing of limousin cattle spermatozoa using the Percoll density gradient centrifugation method can be verified molecularly to separate the sperm of cows carrying X and Y chromosomes tested using the duplex PCR and qPCR methods.

Keywords : spermatozoa sexing, percoll density gradient, molecular verification, duplex PCR, Qpcr