

PENGARUH METODE PENCUCIAN SPERMATOZOA SAPI ACEH TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE HIDUP, DAN INTEGRITAS MEMBRAN PLASMA UTUH SPERMATOZOA

The Influence of Aceh Bull Spermatozoa Washing Method on Spermatozoa Motility and Plasma Membrane Integrity of Intact Spermatozoa

Listin Handayani¹, Dasrul², Muslim Akmal³, Cut Nila Thasmi², Hamdan², dan Mulyadi Adam⁴

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Embriologi dan Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: h_listin@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pencucian spermatozoa dengan *swim up* dan sentrifugasi dalam medium isotonis terhadap kualitas spermatozoa sapi aceh. Dalam penelitian ini digunakan sampel semen segar dari sapi aceh jantan sehat, berumur 3-4 tahun. Segera setelah penampungan semen, dilakukan pemeriksaan kualitas semen segar secara makroskopis dan mikroskopis. Selanjutnya, dilakukan pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi dan *swim up* dalam medium pencucian spermatozoa. Pada kelompok 1, sebagai kontrol (P0) semen yang dicuci dengan larutan isotonis (medium andromed : NaCl fisiologis) dengan perbandingan 1:8; kelompok 2, sebagai perlakuan 1 (P1), semen dipisahkan dengan metode sentrifugasi; kelompok 3, sebagai perlakuan 2 (P2), semen dipisahkan dengan metode *swim up* setelah itu dilakukan pemeriksaan kualitas spermatozoa hasil pencucian. Masing-masing kelompok perlakuan diulangi sebanyak 5 kali. Parameter kualitas spermatozoa yang diukur adalah persentase motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma utuh spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian pola satu arah yang dilanjutkan dengan uji berganda Duncan. Hasil penelitian menunjukkan persentase motilitas spermatozoa kelompok P0; P1; dan P2 masing-masing adalah 72,00±3,74; 66,40±4,77; dan 73,60±3,29%. Persentase viabilitas spermatozoa kelompok P0; P1; dan P2 masing-masing adalah 72,00±3,74; 66,40±2,88; dan 71,80±2,17%. Persentase integritas membran plasma utuh spermatozoa kelompok P0; P1; dan P2 masing-masing adalah sebesar 68,20±1,79; 57,20±3,77; dan 69,00±2,00%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pencucian sperma dengan metode *swim up* dapat meningkatkan kualitas spermatozoa sapi aceh.

Kata kunci: spermatozoa, sapi aceh, sentrifugasi, *swim up*

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of sperm washing by *swim up* and centrifugation in isotonic medium on sperm quality of aceh bull. In this study, fresh semen from healthy male aceh bull aged 3-4 months was collected using artificial vagina. Immediately after semen collection, fresh semen quality was examined macroscopically and microscopically. Subsequently, sperm washing was performed by centrifugation and *swim up* in sperm washing medium. Group 1 (P0) as control group, cement washed with isotonic solution (andromed medium: saline solution) with ratio of 1:8. 2. Group 2 (P1), cement was separated by centrifugation method, group 3 (P2), all cement was separated by *swim up* method then examined the sperm quality sperm washing results. Each treatment was repeated 5 times. Quality parameters measured were the percentage of spermatozoa motility, sperm viability, and plasma membrane integrity intact spermatozoa. Data were analyzed with analysis of variance one-way pattern, followed by Duncan's multiple test. The results showed the mean \pm SD percentage of sperm motility of each treatment group (P0; P1; P2) respectively amounted to 72.00 \pm 3.74, 66.40 \pm 4.77, and 73.60 \pm 3.29%. The percentage of viability was 72.00 \pm 3.74%, 66.40 \pm 2.88%, 71.80 \pm 2.17%. The percentage of plasma membrane integrity is intact spermatozoa was 68.20 \pm 1.79%, 57.20 \pm 3.77%, 69.00 \pm 2.00%. Results of this study showed that the percentage of motility, live spermatozoa and plasma membrane integrity intact after separation by *swim-up* method were significantly different ($P < 0.05$) compared with no separation.

Key words: spermatozoa quality, aceh bulls, centrifugation, *swim up*

PENDAHULUAN

Upaya meningkatkan penampilan hewan ternak sapi dengan daya produksi yang bermutu tinggi dapat ditempuh melalui usaha penyediaan dan menyebarluaskan bibit unggul ternak tersebut, terutama penggunaan pejantan-pejantan unggul, sehingga kontribusi dari ternak sapi terhadap penyediaan pangan asal ternak akan lebih dirasakan. Penyediaan bibit ternak, khususnya sapi aceh masih merupakan suatu masalah. Cara yang paling efektif dan berhasil guna di dalam penyediaan bibit unggul ternak yaitu dengan pengelolaan semen dari bibit unggul yang terseleksi dan menyebarluaskan sifat keunggulannya melalui

inseminasi buatan (IB). Aplikasi teknologi IB merupakan cara yang paling ampuh dalam usaha perbaikan mutu dan peningkatan produktivitas ternak (Toelihere, 1985; Garner dan Hafez, 2000).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas spermatozoa adalah dengan cara melakukan pencucian spermatozoa. Pencucian spermatozoa merupakan suatu cara menganalisis spermatozoa dengan memisahkan komponen-komponen seminal plasma dan bahan-bahan lain yang dapat memengaruhi potensi spermatozoa (Hafez, 2000a). Beberapa penelitian membuktikan bahwa penghilangan plasma semen dengan pencucian setelah penampungan dapat meningkatkan persentase hidup

dan motilitas spermatozoa. Dilaporkan oleh beberapa peneliti pencucian spermatozoa dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya melalui sentrifugasi (Dasrul, 1999), filtrasi kolom sephadexs, dan *swim up* (Mirajuddin, 1997; Yuliani, 2000).

Sentrifugasi merupakan salah satu metode pencucian spermatozoa yang dilakukan dengan cara memutar semen di dalam tabung yang berisi medium isotonis dengan waktu dan kecepatan tertentu (Alvarez *et al.*, 1993, Shakarriz *et al.*, 1995; Henkel dan Schill, 2003; Agarwal *et al.*, 2004). Telah terbukti bahwa pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi dalam medium isotonis seperti *earle's balance salt solution* (EBSS) akan meningkatkan persentase spermatozoa motil dengan morfologi yang normal (Dasrul, 1999; Sterckx *et al.*, 2006, Kaewnoonual *et al.*, 2008; Hee-Jun Chi *et al.*, 2011).

Swim up adalah tata cara siapan yang memungkinkan spermatozoa motil dapat bermigrasi ke permukaan media segar (WHO, 1999). Pemisahan spermatozoa dengan *swim up* didasarkan atas perbedaan kecepatan renang spermatozoa ke luar dari pelet menuju ke permukaan media (De Jounge *et al.*, 1997; Mirajuddin, 1997; Yuliani, 2000). Hasil penelitian Yuliani (2000) pemisahan spermatozoa sapi bali dengan *swim up* dapat meningkatkan perolehan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa serta menurunkan jumlah spermatozoa abnormal.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dan lapangan dengan menggunakan rancangan acak Lengkap (RAL) pola satu arah dengan 3 kelompok perlakuan. Kelompok 1 sebagai kontrol (P0) yaitu semen segar sebelum pencucian. Kelompok 2 sebagai perlakuan 1 (P1) yaitu semen segar yang dicuci dengan sentrifugasi menggunakan medium isotonis (NaCl fisiologis 0,9%). Kelompok 3 sebagai perlakuan 2 (P2) yaitu semen segar yang dicuci dengan metode *swim up* selama 5 menit menggunakan medium isotonis. Masing-masing kelompok perlakuan diulangi sebanyak lima kali.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara bertahap yang dimulai dari penampungan semen dan pemeriksaan kualitas semen segar, pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi dan *swim up* dalam medium pencucian spermatozoa dan pemeriksaan kualitas spermatozoa hasil pencucian.

Pembuatan Medium Pencucian

Sebagai medium pencucian spermatozoa digunakan medium modifikasi yang dikembangkan oleh Rasul *et al.* (2009) yaitu campuran medium andromed dengan larutan NaCl fisiologis dengan perbandingan 1 : 8. Campuran medium ini sebelum digunakan untuk proses pencucian terlebih dahulu diuji kemampuannya sebagai pengencer dalam mempertahankan kemampuan hidup spermatozoa sapi. Hasil penelitian pendahuluan medium campuran ini mampu mempertahankan

kemampuan hidup spermatozoa sapi aceh tetap baik (>40 %) selama 4-6 jam pada suhu kamar.

Penampungan Semen dan Pemeriksaan Kualitas Semen Segar

Sampel semen yang akan digunakan diambil dari sapi aceh jantan sehat, berumur 3-4 tahun dengan berat badan 300-350 kg, dalam kondisi sehat dan tidak memperlihatkan adanya gejala penyakit menular. Semen diambil dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan. Penampungan dilakukan pada pagi hari (jam 9.30 s/d 10.30 WIB) satu kali dalam seminggu.

Segera setelah penampungan semen, dilakukan pemeriksaan kualitas secara makroskopis (volume, warna, konsistensi, dan bau) dan mikroskopis (konsentrasi, motilitas, hidup mati spermatozoa, dan abnormalitas spermatozoa). Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa > 600 juta/ml dan motilitas progresif >70%, abnormalitas < 20% digunakan sebagai sampel. Pemilihan sampel semen yang berkualitas baik didasarkan kriteria yang ditetapkan oleh Balai Inseminasi Buatan Singosari. Setelah penilaian sampel semen yang diperoleh diencerkan dengan medium isotonis dengan perbandingan 1 : 2. Kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi steril untuk perlakuan selanjutnya.

Pencucian Spermatozoa dengan Sentrifugasi

Sebanyak 1 ml suspensi semen dimasukkan dalam masing-masing tabung yang sudah diisi medium isotonis sebanyak 3 ml, selanjutnya disentrifuga dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit pada temperatur kamar. Setelah sentrifuga, dengan menggunakan pipet buang supernatannya dan pelet bagian bawah selanjutnya resuspensi dengan medium isotonis (NaCl fisiologis 0,9%) sebanyak 3 ml. Selanjutnya disentrifuga dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit untuk proses pencucian. Kemudian buang supernatannya dan pelet yang tertinggal diresuspensi lagi dengan 3 ml medium isotonis, dan dibiarkan selama 10 menit pada posisi tegak lurus. Selanjutnya, diambil dengan menggunakan pipet *suspense* bagian atas sebanyak 0,2-0,5 ml, lalu diamati kualitas (motilitas, hidup mati, dan integritas membran plasma) spermatozoa.

Pencucian Spermatozoa dengan *Swim up*

Medium yang digunakan untuk *swim up* adalah medium isotonis (NaCl fisiologis 0,9%). Sebanyak 3 ml medium dipipet dan dimasukkan dalam tabung sentrifugasi yang telah berisi semen sapi aceh segar 1 ml secara hati-hati melalui dinding tabung. Kemudian tabung yang sudah berisi tersebut dimiringkan dengan sudut kemiringan 45° C dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 30 menit. Selanjutnya, dikembalikan secara hati-hati ke arah posisi berdiri dan lapisan paling atas diambil sebanyak 1 ml untuk pengamatan paramater.

Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan menggunakan gelas obyek yang ditetesi 10-15 µl semen

dan tutup dengan gelas penutup. Pemeriksaan dilakukan dengan pembesaran 400 kali menggunakan mikroskop cahaya biasa atau mikroskop fase kontras. Spermatozoa yang motil akan nampak bergerak maju ke depan. Selanjutnya spermatozoa yang motil dihitung dan diberi jumlah seluruh spermatozoa yang tampak dalam satu lapangan pandang, dan dinyatakan dalam persen (%).

Pemeriksaan Persentase Hidup Spermatozoa

Perhitungan persentase hidup spermatozoa dilakukan melalui teknik pewarnaan dengan cara mencampurkan semen dengan larutan eosin negrosin pada gelas obyek, kemudian dibuat preperat ulas dan dikeringkan. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna sedangkan spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna atau berwarna putih. Selanjutnya spermatozoa yang hidup dihitung dan dibagi jumlah seluruh spermatozoa (spermatozoa hidup + spermatozoa mati) yang tampak dalam satu lapang pandang dan dalam persen (%).

Pemeriksaan Integritas Membran Plasma Spermatozoa

Pemeriksaan integritas membran plasma spermatozoa dilakukan berdasarkan uji pembengkakan atau *hyposmotik swelling test* (HOS-Test) sebagaimana yang dikembangkan oleh Rasul *et al.* (2009). Sebanyak 0,1 ml suspensi sperma hasil pencucian ditambahkan ke dalam 0,9 ml larutan hiposmotik 0,032 m (yang dibuat dari 7,35 g Na sitrat 2H₂O, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter akuades) dan diinkubasikan selama 1 jam di dalam inkubator pada suhu 37° C. Selanjutnya, dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan 1 tetes larutan di atas dengan 1 tetes eosin nigrosin, diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Spermatozoa dihitung dengan cara berurutan atau zig zag sampai 10 lapang pandang atau jumlah spermatozoa 100-200. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma yang utuh ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti dengan ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedangkan spermatozoa yang membran plasmanya sudah rusak ditandai dengan tidak ada pembengkakan kepala dan ekor yang lurus.

Analisis Data

Data hasil penelitian persentase kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma utuh) yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis varian (Anava), dan dilanjutkan dengan uji berganda Duncan untuk membedakan antar kelompok perlakuan (Steel dan Torrie, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Sapi aceh

Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen untuk diolah adalah hasil evaluasi kualitas segar. Persyaratan yang harus dipenuhi agar semen segar

layak diolah meliputi volume dan pH semen, gerakan massa, konsentrasi, motilitas progresif, dan abnormalitas sperma serta sejumlah ukuran biokimia lainnya. Hasil pemeriksaan kualitas semen segar sapi aceh setelah koleksi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata (\pm SD) kualitas semen segar sapi aceh setelah koleksi

Parameter	Hasil pengamatan
Volume (ml)	3,80 \pm 0,39
Warna	Krem keputih-putihan
Konsistensi	Kental
Gerak massa	+++
pH	6,96 \pm 0,17
Motilitas (%)	77,00 \pm 4,47
Konsentrasi (10 ⁶ / ml)	1182,00 \pm 88,71
Persentase spermatozoa hidup (%)	87,80 \pm 3,27
Abnormalitas (%)	7,40 \pm 2,07
Membran plasma utuh (MPU, %)	85,00 \pm 2,35

Volume Semen

Rata-rata volume sapi aceh dari lima ejakulat yang digunakan pada penelitian ini adalah 3,80 \pm 0,19 ml, dengan kisaran 3,20-4,20 ml. Rata-rata volume semen yang diperoleh pada penelitian lebih rendah dibandingkan pada sapi brahman umur 3,5 tahun yakni 4,72 \pm 1,82 ml/ejakulat (Kuswahyuni, 2009), pada sapi bali umur 5 tahun adalah 4,5 \pm 2,3 ml/ejakulat, pada sapi Limousin berumur 3 tahun volume ejakulat adalah 5,2 \pm 1,2 ml/ejakulat (Aminasari, 2009), dan sapi Simmental yang berumur 3,5 tahun yaitu 5,08 \pm 0,71 ml/ejakulat (Hasibuan, 2009), namun relatif lebih tinggi dibandingkan dengan volume semen sapi PO umur 2-3 tahun yaitu 2,6 \pm 1,5 ml/ejakulat (Affandhy, 2009).

Warna, Konsistensi, dan Konsentrasi

Warna semen merupakan cerminan dari kekentalan semen dan konsentrasi semen. Dalam kondisi normal semakin tinggi konsentrasi spermatozoa yang terkandung dalam semen, semakin kental konsistensi semen dan semakin pekat warnanya (Toelihere, 1985). Rata-rata warna semen yang diperoleh berwarna putih susu atau krem keputihan dan konsistensinya berkisar antara sedang sampai kental (rata-rata agak kental). Hasil ini juga serupa dengan yang dilaporkan Wijono (1999) bahwa warna semen segar sapi madura adalah krem keputihan atau putih susu dengan konsistensi rata-rata agak kental.

Derajat Keasaman (pH)

Rata-rata derajat keasaman semen sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini adalah 6,96 \pm 0,17 berkisar antara 6,8 sampai 7,2. Hasil ini hampir sama dengan yang diperoleh pada penelitian ini masih dapat dikatakan normal karena Bearden dan Fuquay (1984) menyatakan bahwa rata-rata pH semen yang normal adalah 5,9-7,3.

Gerakan Massa, Motilitas, dan Spermatozoa Hidup

Ciri utama spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai gerakan massa dan motilitas dengan daya gerak yang progresif. Gerakan massa spermatozoa merupakan cerminan dari motilitas atau gerakan

individu. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa bergerak ke depan, maka gerakan massa akan semakin baik (semakin tebal dan pergerakannya semakin cepat). Rata-rata gerakan massa yang diperoleh dari semen segar yang digunakan pada penelitian ini adalah berkisar antara (++) sampai (+++). Hasil ini setara dengan yang dilaporkan oleh Toelihere (1985) bahwa gerakan massa spermatozoa sapi yang layak diproses berkisar antara (++) sampai (+++).

Persentase motilitas dan hidup spermatozoa semen segar sapi aceh yang diperoleh adalah $77,00 \pm 4,47\%$ dan $87,80 \pm 3,27\%$. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan Dewi *et al.* (2012) bahwa persentase motilitas dan hidup spermatozoa sapi bali di Indonesia adalah sebesar $74,50 \pm 3,69\%$ dan $88,03 \pm 3,07\%$.

Kualitas Spermatozoa Sapi Aceh setelah Pencucian

Kualitas spermatozoa sapi aceh yang diukur pada penelitian ini meliputi persentase motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan persentase membran plasma utuh.

Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Aceh

Motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa sebelum atau setelah pencucian selalu digunakan sebagai pegangan yang termudah dalam menilai semen untuk inseminasi atau fertilisasi *in vitro*. Daya gerak progresif ini mempunyai peranan yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Kecepatan pergerakan spermatozoa untuk masing-masing spesies berbeda-beda dan bervariasi sesuai dengan kondisi medium dan suhu lingkungannya (Toelihere, 1985; Partodihardjo, 1987). Hasil pengamatan rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi aceh setelah pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi dan *swim up* mengalami penurunan dibandingkan dengan kontrol (Tabel 2).

Persentase motilitas spermatozoa memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara kontrol dengan kelompok perlakuan sentrifugasi dan *swim up*. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pencucian dengan sentrifugasi dan *swim up* berpengaruh secara nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa sapi aceh. Persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan P2 lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibanding dengan perlakuan P1 dan lebih tinggi secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Persentase motilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan P1 lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan *swim up* dapat menyebabkan peningkatan persentase motilitas spermatozoa sapi aceh, sedangkan pencucian

spermatozoa dengan sentrifugasi dapat menurunkan persentase motilitas spermatozoa sapi aceh.

Meningkatnya nilai persentase motilitas spermatozoa sapi aceh setelah perlakuan pencucian dengan metode *swim up* sangat wajar terjadi karena spermatozoa yang dihitung merupakan spermatozoa yang mampu berenang ke bagian atas. Spermatozoa ini sudah terpisah dari spermatozoa immotil dan abnormal atau spermatozoa yang teraglutinasi. Faktor lain yang ikut merangsang peningkatan persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan pemisahan dengan *swim up* juga kemungkinan diakibatkan oleh karena spermatozoa tersebut sudah mengalami kapasitas dini. Spermatozoa yang mengalami kapasitas ditandai dengan terjadinya peningkatan metabolisme dan spermatozoa menjadi hiperaktivasi atau bergerak lebih progresif. Sebaliknya, persentase motilitas spermatozoa mengalami penurunan yang bermakna setelah pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Menurunnya persentase motilitas spermatozoa setelah proses pencucian dengan sentrifugasi ini sangat wajar terjadi karena spermatozoa telah mengalami serangkaian perlakuan mulai proses pencucian yang membutuhkan banyak energi untuk tetap menormalkan kondisi fisiologisnya. Terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa, merupakan salah satu faktor yang menyebabkan menurunnya nilai motilitas spermatozoa, bila dihubungkan dengan ketersediaan energi bagi spermatozoa. Harris *et al.* (1981) melaporkan bahwa motilitas spermatozoa akan menurun jika plasma seminalisnya dipisahkan dari spermatozoa. Plasma seminalis selain merupakan medium transportasi bagi spermatozoa juga banyak mengandung komponen-komponen elektrolit yang dapat menstimulir metabolisme untuk menghasilkan sejumlah energi berupa adenosin tri fosfat (ATP) yang penting untuk pergerakan spermatozoa. Metabolisme spermatozoa sangat dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme energi yang ditunjang oleh lingkungan antara lain temperatur dan komponen yang terdapat dalam medium ekstraseluler sehingga dengan keterbatasan energi endogen yang dimilikinya dan eksogen yang dapat digunakan dari medium ekstraseluler memengaruhi daya gerak spermatozoa. Selain itu, menurunnya motilitas spermatozoa setelah proses pemisahan dengan sentrifugasi medium isotonis diakibatkan oleh terjadinya gesekan antara dinding tabung dengan spermatozoa pada waktu sentrifugasi, sehingga akan merangsang terjadinya kerusakan membran spermatozoa. Rusaknya membran plasma spermatozoa ini menyebabkan proses metabolisme menjadi terganggu, sehingga ATP sebagai sumber energi spermatozoa menjadi rendah.

Tabel 2. Rata-rata (\pm SD) kualitas spermatozoa sapi aceh sebelum dan setelah pemisahan dengan sentrifuga dan *swim up*

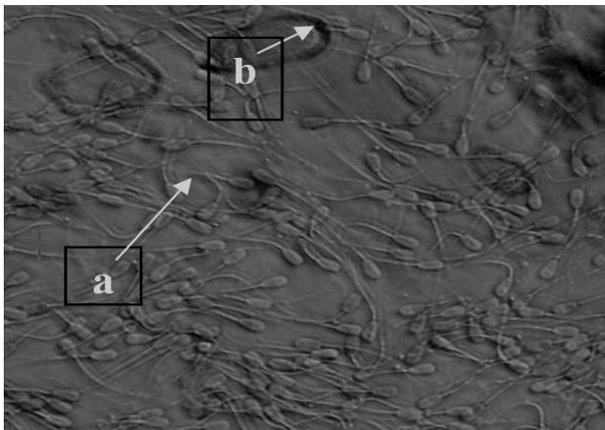
Perlakuan	r	Motilitas spermatozoa (%)	Viabilitas spermatozoa (%)	MPU spermatozoa (%)
Sebelum pencucian (P0)	5	$72,00 \pm 3,04^a$	$73,40 \pm 3,05^a$	$68,20 \pm 1,79^a$
Setelah pencucian dengan sentrifugasi (P1)	5	$66,40 \pm 4,77^b$	$68,40 \pm 2,07^b$	$57,20 \pm 3,77^c$
Setelah pencucian dengan <i>swim up</i> (P2)	5	$73,60 \pm 3,29^a$	$74,00 \pm 2,92^a$	$69,00 \pm 2,00^a$

^{a, b, c}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). MPU= Membran plasma utuh

Hasil penelitian ini sedikit berbeda dengan hasil penelitian Guzman *et al.* (2002) yang menemukan adanya peningkatan persentase motilitas setelah pencucian dengan sentrifugasi. Persentase motilitas setelah sentrifugasi dengan medium isotonis selalu di atas 80%. Perbedaan hasil yang diperoleh mungkin disebabkan karena medium isotonis yang digunakan pada penelitian ini lebih tinggi dari yang digunakan oleh kedua peneliti tersebut. Hal ini mengakibatkan tekanan osmosis dan viskositas pengencer juga lebih tinggi. Keadaan tersebut cenderung menurunkan daya tahan hidup spermatozoa. Di samping itu, hasil yang berbeda dapat pula disebabkan oleh faktor peralatan dan cara penanganan media yang berbeda, terutama terhadap kondisi yang memengaruhi sifat-sifat biologis, seperti suhu penyimpanan (Hafez, 2000b).

Persentase Spermatozoa Hidup

Hasil pemeriksaan spermatozoa hidup terlihat spermatozoa yang hidup memiliki membran utuh sehingga meskipun lingkungan di sekitarnya berwarna, kepala tetap tidak akan berwarna (transparan) dikarenakan permeabilitas membran masih normal, sedangkan spermatozoa yang mati maka membran tidak mampu untuk mencegah masuknya pewarna karena telah rusak. Sebagai akibatnya, kepala spermatozoa akan berwarna sesuai dengan warna eosin yaitu merah muda. Gambaran spermatozoa hidup dan mati disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Gambaran spermatozoa hidup sapi aceh sebelum dan sesudah pencucian yang diamati dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 400x. a= Spermatozoa yang mati ditandai dengan pancaran warna merah, b= Spermatozoa yang masih hidup ditandai dengan adanya pancaran warna terang atau putih

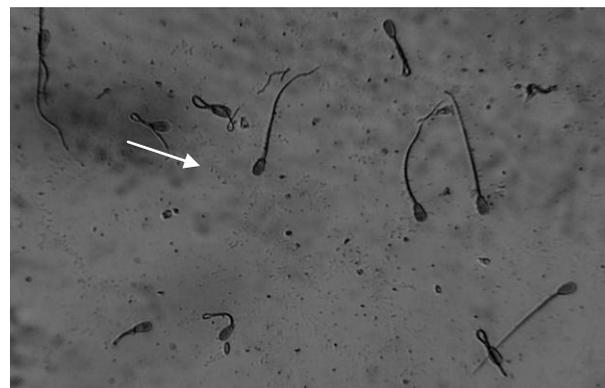
Rata-rata persentase spermatozoa hidup sapi aceh setelah pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Namun, persentase spermatozoa hidup setelah perlakuan *swim up* lebih tinggi daripada kontrol. Persentase spermatozoa hidup memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$) antara kontrol dengan kelompok perlakuan sentrifuga dan *swim up*. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pencucian spermatozoa dengan sentrifuga dan *swim up* berpengaruh secara nyata ($P<0,05$) terhadap persentase spermatozoa hidup

sapi aceh. Persentase spermatozoa hidup pada perlakuan P2 lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dibanding dengan perlakuan P1 dan lebih tinggi secara tidak nyata ($P>0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Persentase spermatozoa hidup pada kelompok perlakuan P1 lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pencucian spermatozoa dengan *swim up* dapat menyebabkan peningkatan persentase spermatozoa hidup sapi aceh, akan tetapi pencucian dengan metode sentrifuga dapat menurunkan persentase spermatozoa hidup sapi aceh.

Peningkatan persentase spermatozoa hidup setelah proses pemisahan dengan *swim up* diakibatkan oleh terpisahnya spermatozoa yang mati dengan yang hidup. Spermatozoa yang hidup dapat bermigrasi keluar dari pelet menuju ke permukaan medium, sedangkan spermatozoa yang mati tetap berada pada lapisan bawah. Pada penelitian ini spermatozoa yang diperiksa adalah spermatozoa yang berada pada *suspense* bagian permukaan saja. Hasil ini ditegaskan pula oleh Correa *et al.* (1996), yang menyatakan bahwa spermatozoa yang berasal dari hasil *thawing* semen beku kemudian diinkubasi selama 20-30 menit dapat menunjukkan perbaikan viabilitas yang maksimal.

Persentase Membran Plasma Utuh

Hasil pengamatan terhadap persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa disajikan pada Gambar 2. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh dan hidup ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti ekor berputar dengan pancaran warna terang. Spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak dan hidup ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna terang. Spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak dan mati ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna merah.



Gambar 2. Integritas membran plasma spermatozoa sapi aceh yang diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 100x

Persentase MPU spermatozoa sapi aceh sesudah pencucian dengan sentrifugasi lebih rendah dibandingkan dengan spermatozoa kelompok sebelum (kontrol) maupun sesudah pencucian dengan *swim up*,

sedangkan persentase MPU spermatozoa setelah pencucian dengan *swim up* lebih tinggi dibandingkan dengan sebelum pencucian (kontrol). Hasil analisis statistik terhadap persentase MPU spermatozoa menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi dan *swim up*. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok kontrol lebih tinggi secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan P1 dan P2. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan P1 lebih tinggi secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan P2. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi dan *swim up* berpengaruh secara sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh. Hasil penelitian ini sejalan dengan pernyataan yang diungkapkan oleh Donnelly *et al.* (1995) bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi dapat menginduksi terjadinya kerusakan membran plasma spermatozoa.

Menurunnya persentase MPU spermatozoa sapi aceh setelah perlakuan pencucian dengan sentrifugasi diduga terjadi akibat pengaruh kimiawi dan mekanik langsung gaya sentrifugasi seperti gesekan permukaan membran spermatozoa dengan dinding tabung selama proses pemisahan. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa penurunan persentase MPU spermatozoa sapi aceh setelah pemisahan dengan sentrifugasi seiring dengan lama dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan. Kondisi ini berkaitan dengan besarnya gesekan mekanik pada permukaan membran spermatozoa. Makin lama waktu dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan makin besar gesekan mekanik yang terjadi pada membran maka makin besar pula kerusakan membran plasma yang terjadi pada spermatozoa. Makin tinggi kerusakan membran plasma spermatozoa akan menyebabkan persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh makin menjadi menurun (Dasrul, 2005).

KESIMPULAN

Pemisahan spermatozoa dengan *swim up* dan sentrifugasi terhadap kualitas (motilitas, hidup mati, dan integritas membran plasma utuh) spermatozoa sapi aceh terdapat perbedaan kualitas (motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma utuh) spermatozoa sapi aceh setelah pemisahan dengan *swim up* dan sentrifugasi dalam medium isotonis.

DAFTAR PUSTAKA

Affandhy, L., W.C. Pratiwi, dan D. Ratnawati. 2009. **Kualitas Semen Pejantan Sapi Peranakan Ongole dengan Perlakuan Pemberian Suplemen Berbeda**. Loka Penelitian Sapi Potong, Bogor.

Agarwal, A., I. Ikemto, and N.K.R. Loughlin. 2004. Level of reactive oxygen species before and after sperm preparation: Comparative of swim up and filtration method. **J. Fertil. Steril.** 79:829-843.

Alvarez, J.G., J.L. Lasso, L. Blasco, R.C. Nunez, S. Heyner, P.P. Caballero, and B.T. Storey. 1993. Centrifugation spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa

from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. **Hum Reprod.** 8:1087-1092.

Aminasari, P.D. 2009. Pengaruh Umur terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. **Skripsi**. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.

Bearden. H.J. and J.W. Fuquay. 1984. **Applied Animal Reproduction**. 2nd ed. Reston Publishing Company, Inc, Virginia.

Correa, J.R., C. Pace, and B. Zavos. 1996. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**. 48(5):721.

Dasrul, 1999. Pengaruh metode preparasi sperma terhadap integritas membran plasma, kualitas dan tingkat kapasitas spermatozoa kerbau lumpur. **Prosiding Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi Di Indonesia**. Malang:21-25

Dasrul, 2005. Peran Senyawa Oksigen Reaktif dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur Hasil Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll. **Disertasi**. Program Studi Ilmu Kedokteran Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.

De Jounge, C.J., S.P. Flaherty, A.M. Barnes, N.J. Swann, and C.D. Matthews. 1997. Failure of multitube sperm swim up for sex preselection. **Journal Fertility and Sterility**. 67:1109-1114.

Dewi, A.S., Y.S. Ondho, dan E. Kurnianto. 2012. Kualitas semen berdasarkan umur pada sapi jantan jawa. **Animal Agriculture Journal**. 1(2):126-133.

Donnelly, E.T., N. McClure, and S.E. Lewis, 1995. The effect of ascorbate and α tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage ion human spermatozoa. **J. Mutagenesis**. 14(5):505-512.

Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In **Reproduction In Farm Animals**. Hafez, B. and E.S.E. Hafez (Eds.). 7th ed. Lippicott Williams & Wilkins, Baltimore.

Hafez, E.S.E. 2000a. Semen Evaluation. In **Reproduction In Farm Animals**. Hafez, B. and E.S.E. Hafez (Eds.). 7th ed. Lippicott Williams & Wilkins, Baltimore.

Hafez, E.S.E. 2000b. X- and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa. In **Reproduction In Farm Animals**. Hafez, B. and E.S.E. Hafez (Eds.). 7th ed. Lippicott Williams & Wilkins, Baltimore.

Harris, S.J., M.P. Milligen, and K.J. Dennis. 1981. Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous. **J. Fert. Steril.** 36:219-221.

Hasibuan, Z.F. 2009. Penggunaan Air Kelapa sebagai Penyeimbang Fruktosa dalam Pengencer terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental. **Skripsi**. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara. Medan.

Hee-Jun Chi, Da-Yeon Chung, Soon-Young Choi, Jong-Hyun Kim, Gi-Young Kim, Jae-Seok Lee, Hee-Sun Lee, Myung-Hee Kim, and Sung-II Roh 2011. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. **Clin. Exp. Reprod. Med.** 38(1):10-17.

Henkel, R.R. and W.B. Schill, 2003. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biol. Endocrinol.** 1:115-122.

Kaewnoonual, N., C.Chiamchanya, P. Visutakul, S. Manochantr, J. Chaiya, and P.T. Thammasat, 2008. Comparative study of semen quality between pre-washed and post-washed with 3 sperm preparation media. **Thammasat Med. J.** 8(3):292-300.

Kuswahyuni, I.S. 2009. Pengaruh lingkaran skrotum dan volume testis terhadap volume semen dan konsentrasi sperma jantan Simmental, Limousine, dan Brahman. **Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Kalimantan Tengah**:157-162.

Mirajuddin, 1997. Pengaruh Preparasi Sperma dengan Metode Sentrifugas Gradient Densitas Percoll dan *Swim up* terhadap Kualitas Spermatozoa dan Angka Konsepsi pada Kambing PE. **Tesis**. Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.

Partodihardjo, S.1987. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Sumber Widya, Jakarta.

Rasul, Z., N. Ahmad, and M. Nazar. 2009. Changes in motion characteristic. Plasma membrane integrity and acrosom morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal Biologi of Reproduction**. 65:217-224.

- Shakarriz, M., A.J. Thomas and A. Agarwal. 1995. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **J. Eur Urol.** 28:31-35.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1990. **Prinsip Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik.** Edisi Kedua. PT. Gramedia, Jakarta.
- Sterckx, J., G. Verheyen, A. De Vos, V.D. Abbeel, and A. Van Steirteghem. 2006. Comparison of two commercial density gradient on sperm motility, fertilization, and embryo quality after in vitro fertilization on sibling oocyte. **Hum. Reprod.** 21:126-130.
- Toelihere, M.R. 1985. **Inseminasi Buatan pada Ternak.** Angkasa, Bandung.
- WHO. 1999. **WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm Cervical Mucus Interaction.** Cambridge University Press, New York, USA.
- Wijono, D.B.M., Komarudin, L. Affandhy, dan A. Rasyid. 1999. Peranan skor kondisi badan dan berat badan terhadap efisiensi pengguna pejantan sapi potong sebagai sumber semen yang optimal. **Prosiding.** Pertemuan Ilmiah Komunikasi dan Penyaluran Hasil Penelitian. Sub Balitnak Klepu. Semarang:16-22.
- Yuliani, E. 2000. Produksi Masal Anak Sapi Bali Jenis Kelamin Tertentu Melalui IB dengan Sperma Sexing. **Webmaster: webadmin@Qustaka-deptan.go.id.**