

PERBANDINGAN KUALITAS SPERMATOOZOA SAPI JANTAN PASCA THAWING DENGAN PENGECER YANG BERBEDA

(Comparison of the spermatozoa quality of bull frozen thawed with different of extenders)

Abdul Malik¹⁾

¹⁾Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian Universitas Islam Kalimantan

Muhammad Arsyad Al Banjari Banjarmasin

JL. Adhyaksa No.02 Kayu Tangi Banjarmasin, Kalimantan Selatan

Email : sidol_99@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects different extenders on motility, membrane and acrosome integrity of post-thawed bull sperm. Twenty ejaculates from four crossbreed bulls were collected. Within 5 min after sperm collection the fresh semen was divided into three groups based on types of extenders; (1) with Tris buffers, (2) with sodium citrate, and (3) with TALP extenders. A computer assisted semen analysis, hypo-osmotic swelling test, and fluorescence isothiocyanate labelled peanut agglutinin (FITC-PNA) techniques were used to determine motility, membrane integrity and acrosome integrity of spermatozoa, respectively, in both fresh ejaculate and frozen thawed semen. The percentage motility, membrane integrity and acrosome integrity in fresh ejaculate were higher than post-thawed. The sperm motility and membrane integrity were no significantly different ($P > 0,05$) among all extenders. Whereas, the membrane acrosome integrity of spermatozoa in post-thawed was significantly different ($P < 0.05$) when TALP extender was compared with sodium citrate, and Tris buffer extenders. In conclusion, all extenders resulted in a better sperm motility, membrane integrity after, while acrosome integrity was no significant after cryopreservation.

Keywords: *Quality of spermatozoa, cryopreservation, motility, membrane and acrosome integrity.*

PENDAHULUAN

Spermatozoa mengandung beberapa komponen penting diantaranya adalah inti, mitokondria, plasma membra, acroso membrane dan organel lainnya. Spermatozoa yang bagus harus mengandung komponen-komponen yang lengkap. Proses pembekuan semen merupakan salah satu sarana untuk menyimpan potensi genetic yang ada di alam, dan juga dapat memfasilitasi program inseminasi pada ternak dalam rangka memperbaiki genetic yang baik (Morton, et al., 2010). Kualitas sperma pasca thawing, seperti motilitas, membrane integrity dan plasma membrane merupakan faktor yang penting dalam rangka keberhasilannya untuk menembus oosit pada saat fertilisasi.

Pada ternak sapi keberhasilan fertilisasi tergantung pada kualitas spermatozoa dan ovum. Spermatozoa yang baik adalah persentase jumlah sperma yang motil, hal tersebut digunakan sebagai

parameter di balai inseminasi untuk menentukan apakah pejantan tersebut baik atau tidak (Muino, et al., 2008). Disisi lain membrane integritas dan plasma membrane merupakan dua faktor penting dalam menentukan keberhasilan inseminasi (Gupta and Bhandari, 2011; Mehmood, et al., 2008). Acrosome integrity merupakan faktor penting pada saat fertilisasi karena akan mengeluarkan enzim yang digunakan untuk menembus pellucida pada proses fertilisasi, keutuhan acrosome integrity serta keutuhan membrane sangat dibutuhkan oleh spermatozoa guna proses fertilisasi yang komplek tersebut.

Pengencer merupakan faktor penting bagi spermatozoa pasca ejakulasi, karena sperma akan mendapat suplai nutrisi dari bahan tersebut. Pengencer yang baik biasanya mengandung beberapa substansi penting seperti gula sederhana seperti glukosa, gliserol, kuning telur dan anti biotik (Holt, 2000). Selanjutnya, Purdy (Purdy,

2006) melaporkan bahwa gula sederhana dalam pengencer sangat penting untuk sumber energy pada spermatozoa. Berdasarkan hal tersebut maka kualitas spermatozoa dapat dipertahankan dengan baik tergantung dari pengencer, karena pengencer akan berinteraksi langsung dengan spermatozoa untuk dapat memproteksi selama proses pendinginan, pembekuan dan pengenceran kembali (thawing) (Holt, 2000). Evaluasi kualitas spermatozoa termasuk motilitas, acrosome integrity dan membrane integrity merupakan hal penting dalam rangka keberhasilan kebuntingan (Mehmood et al., 2008; Rota, et al., 2000). Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan kualitas spermatozoa sapi jantan pasca thawing dengan pengencer yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Penampungan Semen

Sebanyak empat sapi jantan jenis Brangus dengan berat badan sekitar 750-800kg, umur berkisar antara 4-5 tahun yang digunakan sebagai penelitian ini. Sebanyak lima kali penampungan pada masing masing pejantan di ambil selama 1-2 bulan. Penampungan Semen pada penelitian ini menggunakan electro ejaculator (P-T Electronics, model 304, Oregon, and USA). Prosedur penampungan semen dengan elektro ejakulatot mengikuti prosedur dari Barth, (2000) dan Helbig, et al. (2007). Secara singkat dapat di-jelaskan, pejantan yang mau diambil spermatozoanya di masukkan ke kandang jepit. Setelah itu langka awal adalah membersihkan kotoran (feces) dari rectum sebelum probe dimasukkan ke dalam rectum. Setelah probe masuk ke rectum maka perangsangan di mulai dengan menggerakkan power setting dengan ritme sekitar 2-3 detik, lalu power setting secara berlahan di naikkan hingga adanya reaksi yang di tandai dengan keluarnya penis (ereksi). Power stting terus dinaikkan hingga terjadi ejakulasi pada ternak jantan tersebut. Semen yang baru didapat dari koleksi tersebut kemudian dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis.

Persiapan pembuatan pengencer

Sebanyak tiga tipe pengencer yang digunakan untuk penelitian ini. Pengencer A (*Tris Buffer*) terdiri dari 2,42 gr Tris buffer yang dicampur dengan 1,48 gr citrid acid, 1 gr fruktosa, 6,6 gr gliserol, 20 ml kuning telur, 50.000 IU penicilin, 25 mg gentamicin dan 100 ml aquades steril. Semua bahan perlakuan pembuatan pengencer tersebut mengadopsi dari Hong *et al.* (2009). Pengencer B (*Citrat kuning telur*) terdiri atas 2,9% sodium citrate dan 20 % kuning telur adopsi dari Garner *et al.* (2001). Pengencer C (TALP) yang mengadopsi dari Parrish et al. (1988) yang mengandung 3,1 mM KCl (potassium chloride), 100 mM NaCl (sodium chloride), 25 mM NaHCO₃ (sodium bicarbonate), 0,4 mM NaH₂PO₄ 2H₂O (sodium dihydrogen phosphate dihydrate), 0,5 mM MgCl₂ 6H₂O (magnesium chloride hexahydrate), 2 mM CaCl₂ 2H₂O (calcium chloride dihydrate), 21.6 mM Na-Lactate, 10 mM Hepes, penicillin-streptomycin stock 1 mL/100 mL, and phenol red stock 50 µl/100 ml.

Pemeriksaan Motilitas

Motilitas spermatozoa pada fres dan pasca thawing di analisis menggunakan computer assisted semen analyses (CASA, HTM-IVOS-UltiMate; Hamilton Thorn Biosciences, Beverly, MA, USA). Alat tersebut telah disesuaikan penggunaannya untuk menganalisis sperma sapi (Munoz et al., 2009). Perhitungan motility pada fresh dan semen pasca thawing dengan konsentrasi 100 x 10⁶ sperm/mL, kemudian 2 µL dari sampel di letakkan pada 20 µm standard counting chamber (SC20.01.FA; Leja, Niew-Vennep, The Netherlands). Sebanyak 20 kali pandang yang dilihat dan di analisis motilitasnya.

Proses pembekuan semen

Semen segar setelah pengambilan dari pejantan kemudian dibagi menjadi tiga grup sesuai dengan tipe pengencer. Jumlah spermatozoa atau konsentrasi pada saat proses pembekuan setiap straw adalah 25 x 10⁶ spermatozoa/ml. Sedangkan dosis pada setiap straw adalah 0,25 ml. Pembekuan dilakukan dengan proses pendinginan selama 4 jam pada suhu 4° C sebelum proses pembekuan. Setelah seminggu dalam penyimpanan di N₂ cair, kemudian straw diambil secara acak berdasarkan perlakuan untuk di thawing. Thawing di lakukan dengan memasukkan straw pada air steril dengan

suhu 37 °C selama 50 sampai 60 detik. Setelah itu semen dilakukan analisis yang meliputi motilitas, membrane integrity dan acrosome integrity.

Pemeriksaan Membrane Integrity

Pemeriksaan membrane integrity pada fres dan pasca thawing spermatozoa dilakukan dengan menggunakan hypo-osmotic swelling test (HOST) yang diadopsi dari Jeyendran, et al.(1984). Sebanyak 100 µl of semen dicampur dengan 1 mL of hypotonic solution (osmotic pressure 100mOsm/kg) dalam 1000 mL air steril. Campuran tersebut kemudian di inkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah itu contoh sampel sebanyak 15 µl di letakkan dalam slide lalu di kasih cover glas untuk di-lakukan pengamatan di bawa mikroskop (Olympus CK2, ULWCD 0.30) dengan 400x pembesaran. Spermatozoa diklasifikasikan berdasarkan pengamatan ekor yang melingak atau tidak. Minimal t 200 spermatozoa yang diamati untuk dicatat sebagai hasil persentasi membrane integrity.

Pemeriksaan Acrosome Integrity

Pemeriksaan acrosome integrity pada semen segar dan pasca thawing dilakukan dengan modifikasi metode fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) yang diadopsi dari Fazeli, et al.(1997) dan Aboaga and Terada, (2003). Setiap sampel memerlukan sebanyak 30 µL semen yang kemudian di oleskan (smeared pada slide kemudian dikeringkan atau diangin-anginkan. Kemudian slide sperma di fiksasi dengan menggunakan absolute methanol selama 10 menit dan kemudian dikeringkan dan diberikan sebanyak 15 µL of 100 mg/ml FITC-PNA (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO). Selanjutnya slide di inkubasi pada arak slide selama 30 menit pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi slide di cuci dengan PBS pada air mengalir. Kemudian cover slip di taruh pada slide kemudian di beri colorless nail polish. Acrosome integrity diperiksa dan di foto dengan mikroskop epifluorescence microscope (IMT-2; Olympus, Tokyo, Japan) dengan pembesaran 400x. Sperma yang dilakukan stainig dengan FITC-PNA akan memperlihatkan tiga klasifikasi gambar sebagai berikut: Pertama Sperma akan memperlihatkan gambar yang utuh dengan dengan acrosome cap yang lengkap. Kedua Sperma akan terlihat mengalami perubahan pada acrosome (bright fluorescence)

Perbandingan Kualitas Spermatozoa Sapi Jantan Pasca Thawing dengan Pengencer yang Berbeda (Comparison Of The Spermatozoa Quality of Bull Frozen Thawed With Different of Extenders) (Abdul Malik)

indikasi ada pereubahan benntuk acrosome. Ketiga spermatozoa tidak menampakkan acrosome bila dilihat dengan menggunakan fluorescence.

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analysis of variance (ANOVA) selanjutnya dilakukan pengujian statistik dengan menggunakan General Linear Model (Multivariate). Bila terjadi perbedaan yang bermakna pada perlakuan maka dilakukan uji lanjutan menggunakan Duncan. Penghitungan statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase motilitas, membrane integrity dan acrosome integrity pada fres semen dapat di lihat pada Table 1.

Tabel 1. Persentase motilitas, membrane integrity and acrosome integrity spermatozoa pada semen segar.

Parameters	Fresh semen (%rerata ± S.E.M)
Motilitas (%)	75,10 ± 0,50
Membrane integrity (%)	71,03 ± 0,81
Acrosome integrity (%)	67,31 ± 0,94

Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa persentase spermatozoa pada fres semen motilitas masih katagori normal yakni diatas satandar minimum. Hal tersebut di kuatkan pendapat Hopkins and Spitzer (1997) bahwa standar minimum marphologi spermatozoa pada motilitas adalah 70%, sedangkan motilitas pada penelitian ini berkisar 75,10% (table 1).

Tabel 2. Persentase motilitas, membrane integrity and acrosome integrity spermatozoa pada berbagai pengencer yang berbeda.

Jenis Pengencer	Motilitas (% rerata± S.E.M)	Membrane integrity (% rerata± S.E.M)	Acrosome integrity (% rerata± S.E.M)
Sodium citrate	44,67 ± 0,40	42,02 ± 0,31	49,21 ± 0,90 ^b
Tris buffer	43,20 ± 0,50	41,17 ± 0,50	50,09 ± 0,89 ^b
TALP	42,91 ± 0,61	39,04 ± 0,40	40,59 ± 0,90 ^a

^{a,b,c} pada kolom yang dan berbeda superscrip menunjukkan perbedaan yang significant (P<0.05)

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa persentase motilitas dan membrane integritas pasca thawing pada semua bahan pengencer menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) antara semua pengencer (sodium sitrat, Tris buffer, TALP). Sedangkan rata-rata acrosome integrity pasca thawing menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara sodium citrate, tris buffer dengan pengencer TALP.

Pada penelitian ini salah satu parameter adalah membandingkan pengaruh berbagai pengencer terhadap motilitas, membrane integritas dan acrosome integrity pasca thawing. Rerata motilitas, membrane integrity and acrosome integrity pada semen segar adalah 75,10, 71,03 dan 67,31, hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Munoz *et al.* (2009) and Thuwanut *et al.* (2008).

Penilaian kualitas spermatozoa pada fres dan pasca thawing termasuk motilitas dan morfologinya merupakan salah satu metode untuk mengetahui estimasi kemampuan dalam perkawinan (Correa *et al.*, 1997a; Januskauskas *et al.*, 1996). Persentase motilitas sperma pada fres semen biasanya lebih baik disbanding pasca thawing, hal tersebut karena semen pasca thawing akan/telah mengalami beberapa proses seperti proses pembekuan, thawing yang akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada sperma tersebut. Efek yang ditimbulkan pada proses tersebut diantaranya sperma akan mengalami kerusakan pada plasma membrane dan organelnya (Esteso *et al.*, 2003).

Acrosome integritas merupakan salah faktor penting bagi spermatozoa guna mengetahui kemampuannya untuk proses fertilisasi (Garner and Johnson, 1995). Pada penelitian data menunjukkan bahwa acrosome integrity pada pengencer TALP mempunyai nilai yang paling rendah di banding pengencer lainnya. Hal tersebut diduga berkaitan dengan komponen penyusun pengencer tersebut, dimana biasanya pengencer tersebut sering digunakan sebagai bahan untuk pengencer pada kapasitas spermatozoa sehingga hasilnya lebih rendah disbanding pengencer lainnya (Tris buffer dan sodium citrate). These decrease further support findings by Rasul *et al.* (2001) who observed a decline in membrane integrity and acrosome integrity of approximately

20% after cryopreservation process. Furthermore, Watson (2000) dan Beer-Ljubic *et al.* (2011) reported that semen cryopreservation decreased spermatozoa viability.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari pembahasan tersebut adalah semua pengencer memiliki pengaruh yang sama pada motilitas dan membrane integritas pasca thawing kecuali pengencer TALP memiliki efek yang lebih rendah di banding dengan pengencer lainnya dalam acrosome integritas.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboaga, M E; and T. Terada (2003). Trehalose-Enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction.*, 69:1245 - 1250.
- Beer-Ljubic', B; J. Aladrovic; T S Marenjak; and R Laskaj (2011). Biochemical properties of bull spermatozoa separated in iodixanol density solution. *Research Veterinary Science*.doi:10.1016/j.rvsc.2011.01.011.
- Correa., J R; and P M Zavos (1994). The hypo osmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology.*, 70:978 - 983.
- Esteso MC, Fernández SMR, Soler AJ, and Garde JJ: Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by the thawing procedure. *Cryoletters*, 24,261-268, 2003.
- Fazeli, A; W. J Hage; F. P Cheng; W. F Voorhout; A. Marks; and M. M Bevers (1997). Colenbrander B. Acrosome intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod.*, 56:430 - 438.
- Garner, D L; L. Johnson (1995). Viability assessment of mammalian sperm using sybr-14 and propidium iodine. *Biol. Reprod.*, 53.
- Gupta, S K; B. Bhandari (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida

- glycoproteins. *Asian Journal of Andrology*, 13 97-105.
- Holt, WV (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:3-22.
- Hong JHU, Wang QLI, Chen YL, Jlang ZL, Jia YH, Wang LQ, and Ou BB: Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post- thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. *Turk J Vet Anim Sci*, 35, 379 – 384, 2009.
- Jeyendran, R S; H. H. Van der Ven; M. Pe´rez Pela´ez; B. Crabo; and L. J. D Zaneveld (1984). Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Reprod . fertile.*, 70 219-228.
- Mehmood, A; M. Anwar; and S. M Saqlan Naqwi (2008). Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separation by swim-up or percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.anireprosci.2008.02.011.
- Morton, K M; G. Evans; and W. M C Maxwell (2010). Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology*, 74:311-316.
- Muino R, C Tamargo, C Hidalgo, and A Pena I: Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effect of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, 109, 27-39, 2008.
- Parrish, JJ; Susko-Parrish, J; Winer, M.A; and First, NL (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology and Reproductive.*, 38: 1171-1180.
- Purdy, P H (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research.*, 63: 215-225.
- Rasul, Z; N. Ahmad; and M Anzar (2001). Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.*, 22:278-283.
- Thuwanut, P; K. Chatdarong; M Techakumphu; and E. Axner (2008). The effects of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology.*, 70:233-240.
- Watson, P F (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60:481-492.