

# Keutuhan Membran Spermatozoa Disekuensing Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Berpengencer Andromed dan CEP-2 yang Ditambahkan Kuning Telur

(MEMBRANE INTACT OF SPERMATOZOA FOLLOWING SEXING USING PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION IN ANDROMED AND CAUDAL EPIDIDYMAL PLASMA-2 (CEP-2) ADDED WITH 10% EGG YOLK) EXTENDERS

Yudha Fika Diliyana<sup>1</sup>, Trinil Susilawati<sup>2</sup>, Sri Rahayu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145  
E-mail: fika\_181003@yahoo.com, E-mail: yayuksrirahayu8@gmail.com

<sup>2</sup>Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya,  
E-mail: trinil\_susilawati@yahoo.com

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengencer terbaik dalam melindungi membran spermatozoa setelah seksing dengan sentrifugasi *gradien densitas percoll* menggunakan pengencer andromed dan Caudal Epididymal Plasma-2 (CEP-2) ditambah kuning telur 10%. Penelitian ini menggunakan semen segar sapi *limousin* yang di peroleh dari Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari-Malang. Semen sapi yang memenuhi syarat diencerkan dengan pengencer andromed dan CEP-2 + kuning telur 10% kemudian diseksing dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll. Pengamatan membran spermatozoa meliputi integritas membran menggunakan *hypoosmotic swelling test (HOST)*, kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom menggunakan pewarnaan fluoresens *Chlortetracycline*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mengurangi penurunan integritas membran sedangkan spermatozoa yang mengalami kapasitas dan reaksi akrosom tetap rendah. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik dibandingkan dengan pengencer andromed.

Kata-kata kunci : andromed, CEP-2, membran spermatozoa, seksing

## ABSTRACT

The aim of this study was to observe the best extender in protecting the membrane of bovine spermatozoa following sexing by percoll density gradient centrifugation. Freshly collected semen were obtained from Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari-Malang. The semen were diluted in andromed and Caudal Epididymal Plasma-2 (CEP-2) added with 10% egg yolk extenders. The sperm membrane integrity was observed using Hypo-osmotic Swelling Test (HOST). Sperm capacitation and acrosome reaction were assessed using Chlortetracycline Fluorescence Assay. The results showed that andromed and CEP-2 added with 10% egg yolk were able to retain the sperm membrane integrity, whereas sperm capacitation and acrosome reaction were kept low. Caudal Epididymal Plasma-2 (CEP-2) added with 10% egg yolk seemed to give better protection towards the sperm membrane intact in comparison to andromed extender.

**Key words:** andromed, Caudal Epididymal Plasma-2, sexing, sperm membrane

## PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang telah diterima masyarakat dan berkembang pesat saat ini dalam meningkatkan produksi ternak serta meningkatkan mutu genetik ternak. Teknologi ini akan lebih berdaya guna, apabila anak atau

pedet yang dihasilkan berjenis kelamin sesuai dengan yang dikehendaki yaitu dengan menggunakan semen hasil seksing (pemisahan) kromosom X atau Y sebelum dilakukan program inseminasi buatan. Hal ini sangat mendukung program breeding dalam pemilihan bibit unggul serta menunjang efisiensi pada peternakan (Sujoko *et al.*, 2009).

Metode sexing yang telah dilakukan dengan sentrifugasi gradien densitas *percoll* pada spermatozoa sapi berdasarkan hasil penelitian Susilawati *et al.*, (1999), memperoleh proporsi spermatozoa X sebanyak 87% pada lapisan bawah dan spermatozoa Y sebanyak 87% pada lapisan atas, hal ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Ihsan (2008) seksing dengan sentrifugasi *densitas percoll* pada spermatozoa sapi *Frisien Holstein* (FH) dapat memisahkan spermatozoa Y sebanyak 87, 1% pada lapisan atas dan spermatozoa X sebanyak 89,7% pada lapisan bawah.

Proses pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi serta adanya pencucian menyebabkan adanya gesekan mekanis yang dapat mengakibatkan kerusakan membran. Kerusakan membran memengaruhi integritas membran spermatozoa yang menyebabkan perubahan sistem regulasi ion pada membran spermatozoa. Keadaan ini menyebabkan transport ion kalsium ke dalam dan ke luar sel tidak berjalan normal sehingga konsentrasi ion kalsium intraseluler meningkat dan akan terjadi kapasitasi dan reaksi akrosom pada spermatozoa (Rahman, 2007).

Upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan kualitas semen agar tetap baik dan untuk mencegah kerusakan membran spermatozoa setelah sentrifugasi adalah diperlukan pengencer. Bahan pengencer yang ditambahkan dalam semen bertujuan untuk menyediakan nutrisi, bersifat sebagai buffer untuk mempertahankan pH, tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit dalam melindungi spermatozoa (Rothe, 2003). Andromed merupakan salah satu pengencer komersial untuk semen beku dan semen cair. Andromed mengandung lesitin nabati berasal dari kacang kedelai berperan dalam melindungi membran spermatozoa agar tidak terjadi kerusakan selama proses pembekuan dan seksing (Aires *et al.*, 2003). Pengencer *cauda epydidimis plasma* (CEP-2) merupakan pengencer baru untuk semen segar sapi yang sedang dikembangkan berdasarkan kondisi kauda epididimis yang terbukti terbukti dapat memperpanjang masa penyimpanan spermatozoa sapi pada suhu 5°C selama enam hari dan baik dalam mempertahankan motilitas serta integritas membran spermatozoa (Verberckmoes *et al.*, 2004; Duchá, 2012). Penambahan kuning telur 10% pada pengencer CEP-2 yang mengandung nutrisi, fosfolipid dan lipoprotein serta adanya kandungan lesitin mampu melindungi dan

mempertahankan integritas membrane serta mencegah kapasitasi dini spermatozoa (Susilawati, 2002, Delgado *et al.*, 2009; Duchá, 2012).

Penggunaan pengencer andromed saat ini sudah sering digunakan dalam penelitian mengenai spermatozoa, harga pengencer andromed relatif mahal dan merupakan produk impor sehingga perlu mencari pengencer alternatif yang lebih baik dari andromed dengan bahan yang mudah diperoleh dari bahan lokal, dengan harga yang murah serta dapat mempertahankan kualitas spermatozoa tetap baik. Berdasarkan uraian di atas maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas dan membran spermatozoa sapi setelah proses seksing menggunakan sentrifugasi *gradien densitas percoll* menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% .

## METODE PENELITIAN

### Sampel Semen

Dalam penelitian ini digunakan semen sapi yang dikoleksi dari pejantan sapi *Limousin* berumur sekitar empat tahun yang diperoleh dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari-Malang. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa e" 2+, motilitas individu e" 70%. Frekuensi penampungan semen dua kali satu minggu.

### Pengamatan Semen

Sebelum dilakukan proses pemisahan spermatozoa terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan kualitas semen segar yang meliputi warna, pH, konsentrasi spermatozoa, motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, dan integritas membran. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya Malang. Pengamatan spermatozoa yang belum kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom dilakukan di Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Unibraw.

### Pengencer

Pengencer andromed (SIGMA), dibuat dengan cara melarutkan andromed ke dalam *aquabidest* dengan perbandingan 1:4. Pengencer

CEP-2 ditambah kuning telur 10% dikembangkan oleh Verberckmoes *et al.*, (2004) dibuat dengan cara melarutkan bahan-bahan: NaCl 15 mmol/L, KCl 7 mmol/L, CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 3 mmol/L, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 4 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol/L, Fruktosa 55 mmol/L, Sorbitol 1 g/L, BSA 2 g/L, Tris 133,7 mmol/L, gentamicin-S 0,05 g/L, lalu ditambahkan kuning telur 10% dan, asam sitrat 42 mmol/L. Osmolaritas pengencer sebesar 320 mOsm, dengan penyesuaian pH 6,6.

**Pemisahan Spermatozoa**

Gradien densitas yang digunakan dalam pemisahan spermatozoa (seksing) adalah 10 gradien yaitu (20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%). Adapun tahapan dalam pemisahan spermatozoa dengan metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* yaitu: a). mempersiapkan gradien densitas percoll (20-65%) kemudian disusun mulai dari densitas tertinggi sampai terendah (dari 65%-20%), tiap gradien berisi 0,5 mL; b). Semen yang telah diencerkan dengan pengencer andomed atau dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dengan perbandingan 1:1 diambil 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung yang berisi gradien konsentrasi percoll kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2250 rpm selama 7 menit; c). Hasil sentrifugasi diambil sebanyak 1 mL pada lapisan bawah dan lapisan atas kemudian dipindahkan ke tabung pencuci yang sudah berisi 3 mL pengencer Andomed atau CEP-2 dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit; d). Supernatan dibuang dan disisakan 2 mL yang banyak mengandung spermatozoa (Susilawati, 2002).

**Pemeriksaan Membran Spermatozoa**

**Integritas Membran.** Integritas atau keutuhan membran sel spermatozoa diuji menggunakan *hyposmotic swelling test* Sejumlah 100 µL semen dimasukkan ke dalam 1 mL larutan hiposmotik (0,31 g natrium sitrat dan 0,565 g fruktosa dilarutkan dalam 50 mL aquades), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya dibuat tetesan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* sebelum dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Spermatozoa dengan membran normal (integritas membran baik) ditandai dengan ekornya melingkar pada bagian ujung, sedangkan spermatozoa dengan membran tidak normal ditandai dengan ekor lurus (Fonseca *et al.*, 2005; Susilawati, 2011).

**Pengamatan Spermatozoa yang Mengalami Kapasitasi dan Reaksi Akrosom**

Pengamatan spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom dilakukan menggunakan pewarnaan *chlortetracycline* (CTC, Sigma, USA). Semen sebanyak 100 mL ditambahkan 100 mL pewarna CTC kemudian ditambahkan 8 mL CTC *fixative* dan *divortex* selama satu menit, larutan tersebut diambil sebanyak 10 mL dan ditempatkan pada objek glass, kemudian ditambahkan 10 mL DABCO dan dicampur dengan hati-hati lalu ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya ditutup dengan *tissue* yang tebal dan ditekan secara hati-hati, selanjutnya tepi *cover glass* ditutup dengan kutek. Pengamatan dilakukan dengan Mikroskop *Epi-fluoresence* menggunakan filter UV-2A dengan perbesaran 400x. Pengamatan spermatozoa belum terkapasitasi ditandai dengan seluruh kepala berwarna terang. Spermatozoa terkapasitasi ditandai dengan setengah bagian atas kepala berwarna terang. Spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom ditandai adanya bentuk cincin berwarna terang melingkar pada bagian tengah kepala (Singh *et al.*, 2001).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Kualitas Semen Segar**

Hasil pemeriksaan semen segar secara makroskopis menunjukkan warna putih kekuningan dengan derajat keasaman / pH 7 (Tabel 1). Garner dan Hafez (2008) menyatakan kisaran rata-rata pH semen sapi yaitu antara 6,4-7,8 dengan warna normal yaitu putih kekuningan hal ini disebabkan

Tabel 1. Rataan kualitas semen segar

Parameter	Rataan ± SD
pH	7,00±0,00
Warna	Putih kekuningan
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	70,00±0,00
Viabilitas (%)	95,12±1,42
Abnormalitas (%)	5,28±3,46
Konsentrasi (10v/ml)	1432,50±450,80
Integritas membran (%)	88,59±3,74
Kapasitasi (%)	9,37±2,86
Reaksi akrosom (%)	3,08±1,01

karena adanya riboflavin dalam semen (Susilawati, 2002).

Hasil pemeriksaan mikroskopis semen segar sapi *Limousin* pada Tabel 1 menunjukkan motilitas massa dan motilitas individu adalah ++ dan  $70 \pm 0,00\%$ . Persentase motilitas semen segar sapi *Limousin* dalam penelitian ini tergolong baik, menurut Cambell *et al.*, (2003), menyatakan bahwa spermatozoa dengan motilitas sangat baik berkisar antara 70-80%. Penelitian Ihsan (2008) memperlihatkan hasil motilitas massa dan motilitas individu semen segar sapi *Frisien Holstein* (FH) sebesar ++ dan  $72,00 \pm 2,51$  hal ini tidak berbeda jauh dari hasil penelitian Rahmah (2007) memperlihatkan hasil motilitas massa dan motilitas individu semen segar sebesar ++ dan 71,75%. Viabilitas spermatozoa semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $92,12 \pm 1,42\%$ . Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan Pamungkas *et al.*, (2005) menunjukkan hasil persentase viabilitas spermatozoa semen segar  $91,37 \pm 1,18\%$ . Abnormalitas spermatozoa semen segar hasil dari pengamatan dalam penelitian ini sebesar  $5,28 \pm 3,46\%$  hal ini menunjukkan bahwa semen segar yang digunakan masih baik. Campbell *et al.*, (2003) menyatakan bahwa spermatozoa yang baik apabila memiliki abnormalitas spermatozoa kurang dari 20-25%. Konsentrasi spermatozoa semen segar dalam penelitian ini adalah  $1432,50 \pm 450,80$  juta spermatozoa/mL masih tergolong normal. Garner dan Hafez (2008) menyatakan konsentrasi semen sapi berkisar 1000-2000 juta/ml dan konsentrasi spermatozoa pada sapi jantan dewasa berkisar antara 800-1.200 juta/ml (Cambell *et al.*, 2003).

Pemeriksaan kondisi fisiologi semen segar pada Tabel 1, menunjukkan spermatozoa yang memiliki integritas membran baik pada penelitian ini sebesar  $88,87 \pm 3,11\%$ . Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya pada sapi *Frisien*

*Holsten* (FH) menunjukkan bahwa integritas membran spermatozoa semen segar sebesar  $79,80 \pm 4,81\%$  (Ihsan, 2008). Integritas membran yang baik pada pengamatan ini tergolong tinggi, hal ini didukung dengan tingginya persentase viabilitas semen segar sebesar  $92,12 \pm 1,42\%$ , motilitas massa (++) dan motilitas individu 70%. Hasil pengamatan spermatozoa semen segar menunjukkan spermatozoa belum kapasitasasi sebesar  $85,94 \pm 4,45\%$ , kapasitasasi sebesar  $10,54 \pm 3,30\%$  dan reaksi akrosom sebesar  $3,52 \pm 1,20\%$ . Hasil penelitian ini juga tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian (Rahmawati, 2011) spermatozoa semen segar pada sapi bali spermatozoa belum kapasitasasi 77,51%, kapasitasasi 15,77%, dan reaksi akrosom sebesar 6,92%.

### Persentase Integritas Membran Spermatozoa

Persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik setelah seksing dengan sentrifugasi menunjukkan menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas atau lapisan bawah lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer andromed pada lapisan atas atau lapisan bawah (Tabel 2). Pada setiap pengencer dengan andromed dan CEP-2 + KT 10% pada lapisan atas memiliki integritas membran baik lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan bawah. Seksing spermatozoa menggunakan pengencer CEP-2 + KT 10 % lebih baik dibandingkan dengan pengencer andromed dalam menjaga integritas membran spermatozoa.

Persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik berdasarkan uji-T berpasangan menunjukkan spermatozoa yang memiliki integritas baik setelah seksing pada lapisan atas menggunakan pengencer andromed tidak berbeda ( $P > 0.05$ ) dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Spermatozoa

Tabel 2. Rataan persentase membran spermatozoa setelah seksing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10%

Parameter	Andromed		CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
	Lap. atas	Lap. Bawah	Lap. Atas	Lap. bawah
Integritas membran (%)	$85,15 \pm 5,10$	$82,91 \pm 7,16$	$85,41 \pm 4,52$	$83,14 \pm 1,30$
Kapasitasi (%)	$18,62 \pm 5,56$	$17,06 \pm 2,66$	$16,84 \pm 4,32$	$16,95 \pm 3,81$
Reaksi akrosom (%)	$7,74 \pm 1,42$	$7,08 \pm 1,95$	$6,84 \pm 0,84$	$6,31 \pm 0,75$

Keterangan: CEP-2: *cauda epididymal plasma-2*

yang memiliki integritas baik pada lapisan bawah menggunakan pengencer andromed tidak berbeda ( $P > 0,05$ ) dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Spermatozoa yang memiliki integritas baik hasil seksing menggunakan pengencer andromed pada lapisan atas menunjukkan hasil tidak berbeda ( $P > 0,05$ ) dengan lapisan bawah. Spermatozoa yang memiliki integritas baik hasil seksing dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas menunjukkan hasil tidak berbeda ( $P > 0,05$ ) dengan lapisan bawah.

Integritas membran spermatozoa yang masih baik menunjukkan bahwa fosfolipid dapat bertahan dan menjaga dengan baik terhadap benturan antara tabung dan medium saat seksing dengan sentrifugasi *densitas percoll*. Yulnawati (2008) menyatakan fosfolipid berfungsi untuk memelihara integritas membran dan membentuk permukaan yang dinamis antar sel sebagai perlindungan terhadap kondisi lingkungan. Proses seksing dengan sentrifugasi dapat menyebabkan lepas sebagian fosfolipid membran spermatozoa akibat dari pengaruh mekanik yaitu adanya gaya sentrifugal. Lepasnya sebagian fosfolipid membran dapat menyebabkan integritas membran terganggu sehingga berpengaruh pada viabilitas membran. Viabilitas dapat mempengaruhi motilitas dan integritas membran spermatozoa sehingga diduga spermatozoa yang motil tidak semua memiliki integritas membran yang baik (Djauhari, 2012).

Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi integritas membran lebih baik dibandingkan dengan pengencer andromed meskipun secara statistika tidak signifikan. Pengencer andromed dan CEP-2 dalam penelitian ini terlihat dapat melindungi integritas membran dengan baik, hal ini ditunjukkan bahwa adanya integritas membran yang tinggi pada lapisan atas maupun bawah. Lipoprotein dan lesitin yang terdapat pada andromed dan kuning telur yang ditambahkan pada CEP-2 dapat berperan dalam mempertahankan serta melindungi integritas selubung spermatozoa serta dapat melindungi spermatozoa terhadap serangan *reactive oxygen species* (ROS) (Ducha, 2012). Menurut Sariozkan *et al.*, (2010) komponen yang berpengaruh pada lesitin kedelai adalah *low density lipoprotein* (LDL) yang mirip dengan kuning telur, yang dapat melindungi integritas fosfolipid penyusun membran. Komponen utama kuning telur adalah LDL, *high density lipoprotein* (HDL),

dan lesitin (*phospholipid*) (Belitz *et al.*, 2009) yang berfungsi melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Susilawati, 2002). Senyawa LDL yang terdapat pada kuning telur dapat berinteraksi atau berikatan dengan protein *bovine seminal plasma* (BSP), sehingga dapat mengurangi pemindahan kolesterol maupun fosfolipid dari membran spermatozoa dan menyebabkan membran spermatozoa tetap stabil (Amirat *et al.*, 2007).

Proses pemisahan dan pencucian dengan sentrifugasi dapat menyebabkan penurunan persentase integritas membran pada lapisan atas maupun lapisan bawah. Proses sentrifugasi juga dapat menyebabkan terlepasnya seminal plasma spermatozoa atau berkurangnya seminal plasma yang menyebabkan berkurangnya perlindungan terhadap membran sehingga membran spermatozoa menjadi tidak stabil dan akan mengakibatkan motilitasnya rendah. Terpisahnya seminal plasma dapat meningkatkan pembentukan senyawa ROS yang merupakan sekelompok senyawa oksigen yang bersifat reaktif dan dapat merusak berbagai komponen sel yang ada di sekitarnya. Peningkatan ROS ini disebabkan karena antioksidan yang tersedia dalam spermatozoa tidak mampu mengubah oksigen reaktif menjadi senyawa yang netral ( $O_2$ ). Kadar ROS yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid. Lipid membran plasma spermatozoa memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi sehingga menyebabkan spermatozoa sangat rentan terhadap ROS dan dapat menyebabkan penurunan integritas membran spermatozoa, sehingga pada akhirnya menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa (Sanocka *et al.*, 2004).

### **Persentase Spermatozoa yang Mengalami Kapasitas Setelah Seksing**

Persentase spermatozoa yang mengalami kapasitas setelah seksing dengan sentrifugasi menunjukkan bahwa menggunakan pengencer andromed pada lapisan atas atau lapisan bawah lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas atau lapisan bawah (Tabel 2). Menggunakan pengencer andromed membuat spermatozoa yang kapasitas pada lapisan atas lebih tinggi dibandingkan lapisan bawah, sedangkan dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah spermatozoa yang kapasitas memiliki

persentase sama. Seksing menggunakan pengencer CEP-2 + KT 10% lebih baik dibandingkan dengan pengencer andromed dalam menjaga spermatozoa yang kapasitasasi dengan persentase sedikit.

Persentase spermatozoa yang mengalami kapasitasasi berdasarkan uji-T, bahwa spermatozoa yang kapasitasasi sesudah seksing pada lapisan atas menggunakan pengencer andromed tidak berbeda ( $P>0,05$ ) dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Spermatozoa yang mengalami kapasitasasi pada lapisan bawah menggunakan pengencer andromed tidak berbeda ( $P>0,05$ ) dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Spermatozoa yang kapasitasasi hasil seksing menggunakan pengencer andromed pada lapisan atas menunjukkan hasil tidak berbeda ( $P>0,05$ ) dengan lapisan bawah. Begitu pula spermatozoa yang kapasitasasi hasil seksing dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas menunjukkan hasil tidak berbeda ( $P>0,05$ ) dengan lapisan bawah.

Pemisahan spermatozoa dengan metode setrifugasi dan adanya proses pencucian dapat menyebabkan spermatozoa mengalami kapasitasasi karena adanya gesekan atau benturan antar spermatozoa dan juga gesekan antar partikel *percoll* dan dinding tabung dengan kepala spermatozoa sehingga terjadinya perubahan sistem regulasi ion kalsium pada membran spermatozoa. Perubahan tersebut menyebabkan transpor ion kalsium dan terjadi peningkatan kalsium dalam sel (Susilawati, 2005). Proses pencucian dengan sentrifugasi dapat menyebabkan terpisahnya seminal plasma pada spermatozoa, karena seminal plasma berfungsi sebagai sumber energi, tempat hidup yang melindungi spermatozoa. Terpisahnya seminal plasma membuat membran spermatozoa menjadi tidak stabil serta menyebabkan integritas membran menurun sehingga memengaruhi motilitas dan terjadi kapasitasasi spermatozoa (Safitri, 2011).

Dari hasil penelitian ini menunjukkan persentase spermatozoa yang mengalami kapasitasasi rendah, hal ini menandakan integritas serta permeabilitas membran masih stabil. Dari hasil penelitian sebelumnya Ducha (2012) menyatakan bahwa penggunaan pengencer CEP-2 dengan penambahan kuning telur 20% dapat melindungi spermatozoa terhadap ROS, melindungi integritas membrane, dan mempertahankan spermatozoa yang mengalami kapasitasasi. Pengencer andromed

lebih baik dari pada pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% karena dapat memperkecil atau mempertahankan spermatozoa dari proses kapasitasasi. Kandungan lesitin yang terdapat pada andromed dan kuning telur yang ditambahkan pada CEP-2 dapat berperan dalam mempertahankan serta melindungi integritas selubung spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001). Kandungan *bovine serum albumin* (BSA) pada CEP-2 berperan mencegah masuknya  $Ca^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol dan melindungi membran spermatozoa, sehingga meminimalisir spermatozoa yang mengalami kapasitasasi dan reaksi akrosom dini. Senyawa BSA merupakan makromolekul yang berperan mengikat  $Ca^{2+}$ , mencegah masuknya  $Ca^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol, memungkinkan membran untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan kalsium melewati membran dan menghambat akumulasi  $Ca^{2+}$  intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa, sehingga viabilitas, motilitas, dan spermatozoa yang belum terkapasitasasi dapat dipertahankan tetap tinggi (Alvarenga *et al.*, 2004).

#### **Persentase Spermatozoa yang Mengalami Reaksi Akrosom Setelah Seksing**

Pada lapisan atas spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom setelah seksing menggunakan pengencer andromed sebesar  $7,74\pm 1,42$  %, sedangkan pada lapisan bawah sebesar  $7,08\pm 1,95$  % (Tabel 2). Pada lapisan atas spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom setelah seksing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% sebesar  $6,84\pm 0,84$  %, sedangkan pada lapisan bawah sebesar  $6,31\pm 0,75$  % (Tabel 2). Reaksi akrosom spermatozoa setelah seksing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% secara statistika tidak terdapat perbedaan dengan derajat kepercayaan ( $P>0,05$ ).

Proses sentrifugasi menyebabkan kestabilan membran berkurang maka dapat mempermudah perubahan regulasi ion di antaranya  $Ca^{2+}$  karena berkurangnya kolesterol komposisi lipid dan fosfolipid penyusun membran plasma Waltes (2007). Masuknya  $Ca^{2+}$  pada daerah equator membran kepala spermatozoa secara berlebihan ke dalam spermatozoa merupakan faktor pemicu kapasitasasi dan hiperaktivitas motilitas, peningkatan fosforilasi protein tirosin dan reaksi akrosom spermatozoa (Huang *et al.*, 2009).

Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik dalam menjaga spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom dibandingkan dengan pengencer andromed meskipun secara statistika tidak terdapat perbedaan. Rendahnya persentase spermatozoa setelah seksing yang mengalami reaksi akrosom menandakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat melindungi membran akrosom dan dapat meminimalisir reaksi akrosom. Kandungan lesitin yang terdapat dalam pengencer andromed dan kuning telur pada pengencer CEP-2 dapat berikatan dengan membran plasma sehingga dapat mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001). Komponen yang berpengaruh pada lesitin kedelai adalah *low density lipoprotein* yang mirip dengan kuning telur, yang mampu melindungi integritas fosfolipid membran spermatozoa. Sariozkan *et al.*, (2010). Alvarenga *et al.*, (2004) menyatakan bahwa adanya kandungan BSA dapat melindungi integritas membran dan dapat mengurangi radikal bebas serta dapat meminimalisir peningkatan  $Ca^{2+}$  yang masuk pada membran spermatozoa. Senyawa BSA dapat mencegah masuknya  $Ca^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol dan melindungi membran spermatozoa, sehingga mencegah spermatozoa yang kapasitasasi dan reaksi akrosom dini.

### SIMPULAN

Metode pemisahan spermatozoa dengan metode sentrifugasi *gradient densitas percoll* menggunakan pengencer CEP-2 + kuning telur 10% lebih baik dibandingkan dengan pengencer andromed. Hal ini ditandai dengan spermatozoa yang belum kapasitasasi dipertahankan tetap tinggi, sedangkan spermatozoa yang mengalami kapasitasasi dan reaksi akrosom tetap rendah.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penggunaan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam proses pembekuan serta kemampuan fertilisasi dari spermatozoa hasil seksing dengan sentrifugasi *gradient densitas percoll*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bantuan dana penelitian yang dibiayai oleh Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi: Aplikasi teknologi Terpadu dan Intervensi Masyarakat dalam Rangka Penguatan Sistem Industri Sapi Potong Berbasis Lokal.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aires VA, Hinsch, KD, Müller-Schlösser F, Bogner K, Müller-Schlösser S, Hinsch E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60:269-279.
- Alvarenga FCL, Graham JK, Alvarenga MA, Aquires EL. 2004. Calcium Influx Into Equine and Bovine Spermatozoa During In Vitro Capacitation. *Journal Animal Reproductive* 1 (1) : 96-105.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. 2007. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61 : 895-907.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Structure, Physical Properties and Composition Eggs. *Food Chemistry* : 546-561.
- Campbell JR, Kenealy, MD. 2003. *Artificial Insemination. In: Animal Science*. 4<sup>th</sup> Ed. New York. Mc Graw-Hill. New York : 68-72
- Djauhari T. 2012. Pengaruh Penambahan Fosfolipid Terhadap Kualitas spermatozoa Manusia. *Jurnal Kedokteran Universitas Airlangga* 22-30.
- Delgado PA, Lester TD, Rorie RW. 2009. Effect of a Low-Sodium, Choline-Based Diluent on Viability of Bovine Sperm Stored at Refrigerator Temperatures. *Arkansas Animal Science Department Report* : 77-79.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Wahyuningsih S, Pangestu M. 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm After Storage in Cep-2 Extender With and Without Egg Yolk. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(20) : 979-985.

- Fonseca JF, Torrer CAA, Maffili MM. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod* 2(2) : 139-144.
- Fraser LR. 1998. Sperm Capacitation and The Acrosome Reaction. *Human Reprod* 13 : 9-19.
- Garner DL, Hafez ESE. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animals* 7<sup>th</sup> Edition. Philadelphia. USA. Lippincott Williams and Wikins. 96-110.
- Hammadeh ME, George T, Rosenbaum P, Schmidt W. 2001. Association Between Freezing Agent and Acrosome Damage of Human Spermatozoa From Sub Normal and Normal Sperm. *Journal Andrologia* 32:331-336.
- Huang JY, Wang GL, Kong, LJ. 2009. Effect of  $Ca^{2+}$  and  $HCO_3^-$  on capacitation hyperactivation and protein tyrosine phosphorylation in Guinea Pig Spermatozoa. *Journal Asian-Aust Journal Animal Science* 22 (2) : 181 – 186.
- Ihsan NM. 2008. Upaya Peningkatan Konsentrasi Spermatozoa Hasil Pemisahan Dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Sapi Frisien Holstein (FH). *Disertasi*. Malang. Universitas Brawijaya.
- Rahmah Z. 2007. Perubahan Integritas Membran Spermatozoa pada Proses Sexing dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Tesis*. Malang. Universitas Brawijaya.
- Rothe NHI. 2003. Insemination of Cryopreserved Bull Semen Portions with Sperm Numbers After Dilution with Two Egg Yolk-Free Extenders. *Proceeding. European AI Vest Meeting Cattle Session; Budapest* (Hungry). Pp 14-23.
- Safitri DH. 2011. Pengaruh Lama Waktu Sentrifugasi Semen Domba Ekor Gemuk terhadap Persentase Kapasitas dan Reaksi Akrosom Spermatozoa. *Artikel Ilmiah*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 1-11.
- Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(12) : 1–7.
- Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak MN. 2010. The Effects of Diluent Egg Yolk Concentration Used With Soy Bean Lecithin-Based-Extender on Semen Quality of Freeze Bull Semen. *Eurasian Journal of Veterinary Science* 26 (1) : 45-49.
- Singh KS, Gandhi KK. 2001. Capacitation and Acrosome Reaction in Buffalo Bull Spermatozoa Assessed by Chlorotetracycline and Pisum Sativum Agglutinin Fluorescence Assay. *Theriogenology* 55 : 1457–1468.
- Sujoko H, Setiadi MA, Boediono A. 2009. Seleksi Spermatozoa Domba Garut dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner* 10 (3) : 125-132.
- Susilawati T, Sumitro SB, Harjopranto S, Mantara Y, Nuryadi. 1999. Pola Kapasitas Spermatozoa X dan Y Sapi Hasil Pemisahan Menggunakan Filtrasi sepadex dan Sentrifugasi gradien densitas percoll. *Jurnal Penelitian Ilmu-Ilmu Hayati* 11 : 29-40.
- Susilawati T. 2001. Perubahan Kontrol Sistem Transport ion Kalsium Spermatozoa sapi Hasil Sentrifugasi Gradien densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati* 11(2) : 1-9.
- Susilawati T. 2002. Sexing Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah menggunakan Gradien Putih Telur. *Widya Agrika* 10(2) : 97-105.
- Susilawati T. 2005. Tingkat Keberhasilan Kebuntingan dan Ketepatan Jenis Kelamin Hasil Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Beku Sexing pada Sapi Peranakan Ongole. *Journal Animal Production* 7 (3) : 161–167.
- Susilawati T. 2011. *Spermatologi*. Cetakan pertama. Malang. Penerbit UB Press.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, de Kruif A. 2004. Comparison of Three Diluents for The Storage of Fresh Bovine Semen. *Theriogenology* 42-63.
- Walters EM. 2007. Comparative Reproductive Physiology of domestic animals (chapter 4) in: *Comparative Reproductive Biology*. Heide Schatten dan Gheorghe M (Ed). Constantinescu. USA: Blackwell Publishing 79:93.
- Yulnawati. 2008. Maltosa Mempertahankan Viabilitas Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang yang Disimpan dalam Bentuk Cair. *Jurnal Veteriner* 11(1) : 126-130.