

EFEK LAMA SENTRIFUGASI SEMEN DOMBA TERHADAP PERSENTASE KAPASITASI DAN REAKSI AKROSOM SPERMATOZOA

Centrifugation Time Effect of Sheep Semen on Percentage of Sperm Capacitation and Acrosomal Reaction

Suherni Susilowati¹, Dani Hesti Savitri², dan Nusdianto³

¹Departemen Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

²Program Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

³Departemen Klinik Veteriner Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

E-mail: greatanesya@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek sentrifugasi semen domba terhadap persentase kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa. Penelitian ini terdiri atas 3 kelompok semen domba yaitu kelompok kontrol (P0) semen tanpa sentrifugasi, P1 semen disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1800 rpm, dan P2 semen disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok P2 kapasitasasi tidak berbeda nyata dengan kelompok P1, tetapi pada kelompok P0 efek kapasitasasi dan reaksi akrosom paling rendah. Reaksi akrosom spermatozoa pada kelompok P2 menunjukkan hasil yang paling tinggi. Lama sentrifugasi semen domba ekor gemuk dengan kecepatan sentrifugasi 1800 rpm selama 10 menit dapat meningkatkan persentase kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa.

Kata kunci: sentrifugasi, semen domba, kapasitasasi, reaksi akrosom

ABSTRACT

The purpose of this study was to know the effect of sheep semen centrifugation on capacitation and acrosom reaction spermatozoa percentage. The treatments were semen without centrifugation (P0), semen with centrifugation at 1800 rpm for 5 minutes (P1) and semen with centrifugation at 1800 rpm for 10 minutes (P2). The result showed that P2 have the highest capacitation but not significantly different from those of P1, whereas P0 have the lowest effect. Acrosome reaction of spermatozoa on P2 have the highest result among all treatments. In conclusion, time of sheep semen centrifugation of 1800 rpm for 10 minutes decrease the percentage of spermatozoa capacitation and acrosomal reaction.

Key words: centrifugation, semen of sheep, capatitation, acrosom reaction

PENDAHULUAN

Pembuahan secara *in vitro* adalah salah satu cara untuk memproduksi embrio secara buatan di luar tubuh dengan cepat dan murah. Dalam fertilisasi *in vitro*, spermatozoa biasanya diambil langsung dari epididimis atau dari semen yang ditampung menggunakan vagina buatan. Kedua cara ini dapat dilakukan dengan teknik sederhana dan biaya yang murah. Pengambilan spermatozoa dari epididimis dapat dilakukan dengan memanfaatkan limbah rumah potong hewan, sedangkan penampungan semen dapat dilakukan dengan vagina buatan juga menggunakan teknik sederhana dan mudah. Preparasi spermatozoa diperlukan untuk proses fertilisasi *in vitro* yang bertujuan menyeleksi spermatozoa dari plasma semen dan bahan-bahan yang bersifat racun seperti asam laktat, amoniak, dan hidrogen peroksida dengan cara sentrifugasi (Yovich, 1995).

Dampak buruk dari pemisahan plasma semen dengan teknik sentrifugasi adalah meningkatnya pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) oleh spermatozoa. Meningkatnya produksi ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan teknik sentrifugasi diduga merupakan proses yang kompleks dan dapat berasal dari berbagai proses kimia, yang terjadi dalam organel maupun sel atau berasal dari luar sel (Agarwal *et al.*, 2003). Berbagai proses biologis

yang dapat menjadi modulator pembentukan ROS oleh spermatozoa diantaranya modulator kerusakan mekanik pada membran spermatozoa dan terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa (Iwazaki dan Gagnon, 1992). Plasma seminalis adalah suatu medium untuk spermatozoa yang terdiri atas sekresi dari testes, epididimis, dan kelenjar asesoris (Manjunant *et al.*, 1997). Campuran tersebut terdiri atas beberapa faktor seperti bahan-bahan organik dan anorganik yang penting dalam mekanisme maturasi spermatozoa di bawah kontrol hormon dan enzim (Dogan *et al.*, 2009).

Sentrifugasi merupakan metode yang dapat digunakan untuk pencucian spermatozoa pada proses kapasitasasi *in vitro*. Sentrifugasi dapat menimbulkan gaya sentrifugal yang menyebabkan semen terpisah antara bagian yang padat (pelet) dan bagian yang cair (plasma). Semakin besar gaya sentrifugasi yang digunakan pada proses pencucian spermatozoa akan membantu mempercepat berlangsungnya kapasitasasi *in vitro* serta menurunkan integritas membran yang selanjutnya menyebabkan penurunan angka resistensi dan kelayakan kondisi yang meliputi persentase motilitas (pergerakan progresif) dan jumlah spermatozoa hidup. Tekanan gaya sentrifugal yang paling besar akan berada pada bagian ekor (Sardjito, 2003). Makin besar kecepatan dan waktu sentrifugasi menyebabkan tingginya gesekan spermatozoa. Akibatnya, ikatan protein dan lipid membran tidak

stabil sehingga mengganggu permeabilitas membran spermatozoa. Keadaan tersebut menyebabkan persentase spermatozoa hidup dan normal menurun. Hal tersebut dibuktikan jika sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan tinggi, di atas 400x g selama 15 menit, rataan persentase spermatozoa hidup dan normal menurun akibat ketidakmampuan spermatozoa mempertahankan pengaruh gaya gesek tersebut. Perlakuan 400x g selama 15 menit merupakan kombinasi kecepatan dan waktu sentrifugasi optimum, karena diperoleh kualitas spermatozoa maksimum dengan tingkat kematian dan kerusakan spermatozoa rendah (Sujoko *et al.*, 2009).

Keberhasilan fertilisasi *in vitro* membutuhkan sel telur matang dan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasasi. Beberapa penelitian manipulasi *in vitro* dilakukan dengan metode sentrifugasi. Sentrifugasi bertujuan memisahkan spermatozoa yang motil dan yang tidak motil, serta memisahkan komponen plasma semen yang memengaruhi kualitas spermatozoa pada waktu fertilisasi. Sentrifugasi menyebabkan deformasi matriks ekstraseluler spermatozoa termasuk perubahan komposisi lipid membran. Lipid tersebut penting dalam mempertahankan fluiditas membran spermatozoa (Guzman *et al.*, 2001), sehingga lalu lintas ion-ion terganggu dan motilitas spermatozoa menurun (Singh *et al.*, 1992). Sentrifugasi penting untuk menghasilkan sedimen yang mengandung spermatozoa dengan motilitas yang tinggi. Selain itu, sentrifugasi spermatozoa diberikan penambahan media pencuci yang berfungsi menghilangkan faktor dekapasitasi dari plasma semen (VanderVoort, 2004). Salah satu media pencuci tersebut adalah Brackett dan Oliphant (BO) yang mengandung natrium, kalsium, magnesium, natrium klorida, glukosa, piruvat sebagai bahan nutrisi spermatozoa serta asam amino yang sangat dibutuhkan bagi kelangsungan hidup, sedangkan natrium klorida dan glukosa sebagai sumber energi (Rimayanti *et al.*, 1998). Data menunjukkan bahwa spermatozoa domba lebih sensitif terhadap stres dari pada spesies lain (Muino-Blanco *et al.*, 2008).

Berdasarkan hal tersebut di atas, timbul inisiatif untuk meneliti dan mempelajari pengaruh sentrifugasi semen domba terhadap persentase kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini terdiri atas dua tahap yaitu pencucian spermatozoa dan pemeriksaan kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa. Penelitian dimulai dengan menyiapkan medium BO yang suhunya telah disesuaikan terlebih dulu. Sebanyak 0,1 ml semen domba ekor gemuk masing-masing dimasukkan ke dalam tiga buah tabung sentrifus dengan menggunakan pipet. Pada masing-masing tabung diberi kode P0, P1, dan P2 dengan rincian sebagai berikut: tabung P0 sebagai kontrol diisi dengan medium BO sebanyak 0,5 ml, diberi 0,1 ml semen dan tanpa dilakukan sentrifugasi; tabung P1 diisi dengan medium BO

sebanyak 0,5 ml, diberi 0,1 ml semen dan disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit; dan tabung P2 yaitu diisi dengan medium BO sebanyak 0,5 ml diberi 0,1 ml semen dan disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Setelah tahap sentrifugasi selesai, plasma semen yang berada di bagian atas tabung dibuang menggunakan pipet secara hati-hati.

Pemeriksaan Kapasitasasi dan Reaksi Akrosom

Uji terhadap kapasitasasi dan reaksi akrosom dilakukan dengan pewarnaan *chlor tetracycline* (CTC). Sebanyak 45 µl larutan pewarna CTC dimasukkan ke dalam tabung eppendorf kapasitas 1,5 ml yang kemudian ditutup dengan aluminium foil. Selanjutnya tabung tersebut digoyang-goyang selama 2-3 detik kemudian ditambah dengan 8 µl CTC fiksatif dan dilakukan homogenasi selama 10 detik. Lalu diambil 10 µl larutan tersebut dan ditempatkan pada gelas obyek kemudian ditambahkan 10 µl *1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane* (DABCO) dan dicampurkan lalu ditutup dengan gelas penutup. Selanjutnya gelas obyek ditutup dengan kertas tisu yang tebal dan ditekan secara hati-hati. Tahap selanjutnya adalah tepi gelas penutup dilapisi dengan *cutex* (cat kuku). Kemudian preparat tersebut diamati dengan mikroskop fluoresen dengan perbesaran 1000x. Gambaran yang tampak adalah kepala spermatozoa seluruhnya berfluoresen (spermatozoa yang tidak mengalami kapasitasasi), kepala spermatozoa separuh bagian atas berfluoresen (spermatozoa yang mengalami kapasitasasi), dan kepala spermatozoa tidak berfluoresen dan hanya sebagian segmen *aquatorial* yang berfluoresen (spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom) (Susilowati, 2007).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian (Anava) menggunakan uji F dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan's dengan tingkat signifikan 5% (Kusriningrum, 2008).

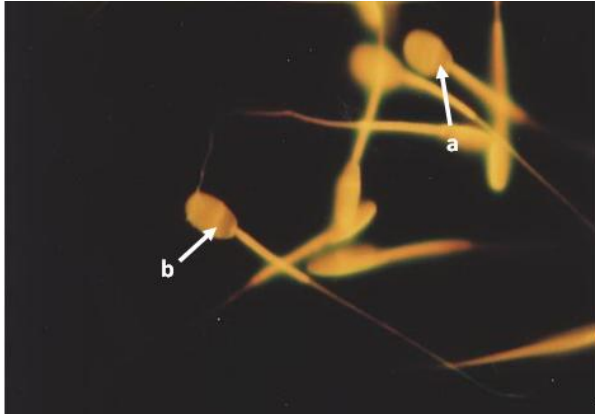
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pengaruh lama waktu sentrifugasi semen domba ekor gemuk terhadap persentase kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa disajikan pada Tabel 1. Gambaran mikroskopis spermatozoa setelah diwarnai dengan pewarna CTC ditampilkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Persentase kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa domba setelah perlakuan

Perlakuan	P0	P1	P2
Kapasitasasi (%)	29,83±1,17 ^c	41,67±5,16 ^b	43,33±6,77 ^a
Reaksi akrosom (%)	27,83±1,47 ^a	28,50±3,20 ^a	29,67±3,83 ^a

^{a, b, c}Superskrip yang berbeda dalam satu baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) dan superskrip yang sama dalam satu baris yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). P0= perlakuan tanpa sentrifugasi, P1= perlakuan dengan sentrifugasi 1800 rpm selama 5 menit, P2= perlakuan dengan sentrifugasi 1800 rpm selama 10 menit.



Gambar 1. Spermatozoa dengan pewarnaan *chlorotetracycline* (400x). a. Kapasitasi (bagian akrosom berfluorescen), b. Reaksi akrosom (bagian segmen equatorial berfluorescen)

Spermatozoa diliputi oleh membran sel yang tersusun dari lipid, protein, dan karbohidrat. Lipid merupakan komponen membran spermatozoa secara keseluruhan, termasuk kemampuan spermatozoa untuk kapasitasi serta membuahi sel telur. Kolesterol merupakan membran lipid yang mempunyai fungsi dalam mempertahankan fluiditas membran. Semakin banyak kandungan kolesterol pada membran akan membuat membran semakin lentur, sebaliknya semakin sedikit kandungan kolesterol pada membran akan menyebabkan spermatozoa semakin mudah mengalami kerusakan. Kandungan kolesterol pada membran akrosom lebih rendah dari pada membran plasma bagian ekor (Park dan Graham, 1992). Pada bagian luar dari kedua lapisan fosfolipid terdapat karbohidrat yang merupakan oligosakarida yang berikatan dengan protein dan membran lipid. Karbohidrat pada membran spermatozoa selain berfungsi sebagai sumber pembentukan adenosin trifosfat (ATP) juga berperan penting dalam proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Herrero *et al.*, 1999). Sentrifugasi dapat menyebabkan terjadinya kapasitasi dan reaksi akrosom pada spermatozoa, akibat pengurangan rasio kolesterol dan fosfolipid pada membran plasma spermatozoa. Kolesterol membran selain penting untuk mempertahankan fluiditas membran spermatozoa juga berperan penting dalam proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa. Pengurangan kolesterol selama kapasitasi akan memungkinkan gerakan lateral protein-protein membran integral secara leluasa dan permeabilitas yang lebih besar terhadap masuknya ion Ca^{2+} ekstraseluler dalam sel untuk memicu terjadinya reaksi akrosom (Cross, 2000).

Berdasarkan analisis data penelitian ini terhadap kapasitasi menunjukkan adanya perbedaan yang nyata di antara ketiga perlakuan ($P < 0,05$). Setelah dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan's diketahui bahwa perlakuan P2 menunjukkan hasil kapasitasi tertinggi meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan P1. Pada perlakuan P2, P1, maupun P0 tidak memberikan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) terhadap reaksi akrosom.

Perlakuan sentrifugasi dengan kecepatan yang sama dan lama waktu yang berbeda ternyata memberikan

perbedaan yang nyata diantara perlakuan terhadap kapasitasi spermatozoa. Pada perlakuan P2 didapatkan hasil kapasitasi spermatozoa tertinggi, yang disebabkan proses sentrifugasi selama 10 menit telah merubah integritas membran spermatozoa akibat dari gesekan fisik maupun kimia. Pada perlakuan P1 didapatkan hasil kapasitasi spermatozoa tertinggi kedua setelah P2, yang kemungkinan disebabkan waktu sentrifugasi lima menit kurang optimal untuk spermatozoa melakukan kapasitasi sehingga tidak semua membran plasma spermatozoa terkikis yang menyebabkan kapasitasi tidak mencapai nilai yang optimal. Reaksi akrosom berurutan dengan rata-rata tertinggi ditunjukkan pada perlakuan sentrifugasi 1800 rpm selama 10 menit. Hal ini terjadi karena pada proses sentrifugasi merusak membran spermatozoa yang mengakibatkan konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler meningkat sehingga memicu terjadinya reaksi akrosom. Hasil penelitian ini hampir sama dengan penelitian Sardjito (2003) yang menyimpulkan semakin besar gaya sentrifugasi yang digunakan semakin menurun integritas membran spermatozoa yang akan mengakibatkan penurunan resistensi dan kelayakan kondisi spermatozoa. Pada kelompok P0 menunjukkan bahwa persentase kapasitasi dan reaksi akrosom terendah karena selama spermatozoa masih berada dalam plasma semen maka membran spermatozoa tetap stabil (Hafez, 2000). Selanjutnya, faktor dekapasitasi akan mengikat permukaan spermatozoa, mengaktifkan kalsium intraseluler-ATPase untuk mempertahankan konsentrasi kalsium intraseluler agar tetap rendah sehingga proses kapasitasi dan reaksi akrosom tidak berlangsung dengan baik. Faktor dekapasitasi dapat menghambat pengeluaran *corona penetrating enzyme* (CPE) dan secara langsung menghambat kapasitasi, reaksi akrosom, dan fertilisasi.

KESIMPULAN

Lama sentrifugasi semen domba ekor gemuk dengan kecepatan sentrifugasi 1800 rpm selama 10 menit meningkatkan persentase kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., RA. Saleh, and MA. Bedalwy. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil and Steril.** 79:829-843.
- Cross, N.L. 2000. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. **J. Biol. Reprod.** 63:1129-1134.
- Dogan, I., U. Polatand, and Z.Nur. 2009. Correlation between seminal plasma enzyme activities and semen parameters in seminal fluid of arabian horse. **Iranian. J.Vet. Res.**10:119-124.
- Guzman, E.G., M. Ollero, M.C. Lopez, R.K. Sharma, J.G. Alvarez, A.J. Thomas, and A. Agarwal. 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **J. Hum. Reprod.** 16(9):1922-1930.
- Hafez, E.S.E. 2000. Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryo. In **Reproduction in Farm Animals.** Hafez, E.S.E. (Ed.). 7th ed. Lea Febiger, Philadelphia.
- Herrero, M.B., E. Lamirande, and C. Gagnon. 1999. Nitrite oxide regulates human sperm capacitation and protein tyrosine. **J. Biol. Reprod.** 61:575-581.

- Iwazaki, A. and C. Gagnon. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patient. **J. Fertil. Steril.** 57:408-416.
- Kusriningrum. 2008. **Perancangan Percobaan.** Airlangga University Press, Surabaya.
- Manjunant, P., I. Therien, and I. Souberyrand. 1997. Major protein of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high density lipoprotein. **Biol. Reprod.** 57(5):1080-1088.
- Muino-Blanco, T., R. Perez-Pe, and J.A. Cebrian-Perez. 2008. Seminal plasma protein and sperm resistance to stress. **J. Reprod. Domest. Anim.** 4:18-31.
- Park, J.E. and J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **J. Theriogenology.** 38:209-222.
- Rimayanti, T. Hernawati, S. Suherni, H. Agoes, dan B. Utomo. 1998. Pengaruh Pengenceran Media EBBS dan BO pada Semen Beku Kambing Etawa terhadap Kejadian Kebuntingan Kambing Lokal. **Laporan.** Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Sardjito T., 2003. Pengaruh Sentrifugasi Spermatozoa Sapi terhadap Integritas Membran, Resistensi dan Kelayakan Kondisi pada Proses Kapasitasi *In-Vitro*. **Thesis.** Universitas Airlangga Surabaya.
- Singh, S.C., N.S. Tomar, K.C. Sharma, and K.D. Sharma. 1992. Studies on acrosomal abnormalities of cattle and buffalo in relation to semen characteristics and fertility. **J. Indian Vet.** 69:267-268.
- Sujoko, H., M.A. Setiadi, dan A. Boediono. 2009. Seleksi spermatozoa domba garut dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll. **J. Vet.** 10(3):1-8.
- Susilowati, S. 2007. Peran Insulin Like Growth Factor-I Complex Plasma Seminalis Kambing terhadap Potensi Biologis Spermatozoa Hasil Sentrifugasi. **Disertasi.** Universitas Airlangga Surabaya.
- VanderVoort, A.C. 2004. High Quality Sperm For Nonhuman Primate: Production and Assessment. **Reprod. Biol. Endocrinol. J.** 2:33.
- Yovich, J.L. 1995. Sperm Preparation for Assisted Conception. In **Gametes The Spermatozoon.** Grudzinskas J.G. and J.L. Yovich (Eds.). Cambridge University Press, New York.