

KUALITAS SPERMATOZOA HASIL *SEXING* MENGGUNAKAN PENGECER ANDROMED DAN *CAUDA EPIDIDYMAL* *PLASMA-2 (CEP-2)* DITAMBAH KUNING TELUR 10%

Quality of Sperm Sexing Results Using Diluters Andromed and Cauda Epididymal Plasma-2 (CEP-2) Supplemented 10% Egg Yolk

Rita Fitria Purwoistri¹, Trinil Susilawati², dan Sri Rahayu¹

¹Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

²Jurusan Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: pritaifitria@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui kualitas spermatozoa setelah *sexing* dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan *cauda epididymal plasma-2 (CEP-2)* ditambah kuning telur 10%. Pengamatan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi, dan total spermatozoa motil. Gradien albumin dibuat dengan cara mencampur putih telur dengan pengencer andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10% sehingga menghasilkan konsentrasi putih telur 10, 30, dan 50%. Pengencer andromed menghasilkan motilitas spermatozoa hasil *sexing* pada lapisan atas yang lebih tinggi daripada pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Pengencer andromed menghasilkan viabilitas, abnormalitas, konsentrasi, dan total spermatozoa motil yang sama seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mengurangi penurunan kualitas spermatozoa.

Kata kunci: andromed, CEP-2, kualitas spermatozoa, *sexing*

ABSTRACT

This study aims to determine the quality of sperm after sexing with gradient albumin using diluters andromed and CEP-2 supplemented with 10% egg yolk. The Observations quality of sperm including motility, viability, abnormality, concentration, and total motile sperm. Albumin gradient was made by mixing egg white with diluters andromed or CEP-2 supplemented 10% egg yolk resulting in a concentration of egg whites 10, 30, and 50%. The results showed that diluter andromed produced sperm motility after sexing at the top layer higher than the diluters CEP-supplemented 10% egg yolk. Diluter andromed produce viability, abnormality, concentration and total motile sperm the same as CEP-2 supplemented with 10% egg yolk. Diluters andromed and CEP-2 supplemented with 10% egg yolk can reduce the decline of sperm quality.

Key words: andromed, CEP-2, quality of sperm, *sexing*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan *sexing* atau pemisahan spermatozoa X dan Y merupakan pilihan tepat untuk mendukung peran inseminasi buatan (IB) dalam rangka meningkatkan efisiensi usaha peternakan. Macam-macam metode *sexing* yang telah dilakukan antara lain metode sedimentasi, *albumin column*, sentrifugasi gradien densitas Percoll, elektroforesis, *H-Y antigen*, *flow cytometri* dan filtrasi dengan *sephadex column*. Metode *sexing* yang mudah diaplikasikan adalah separasi dengan albumin (Hafez dan Hafez, 2000). *Sexing* dengan albumin putih telur didasarkan pada perbedaan motilitas antara spermatozoa X dan Y dengan membuat medium yang berbeda konsentrasinya (Sianturi *et al.*, 2007). Sentrifugasi spermatozoa saat pencuci ketika proses *sexing* menyebabkan penurunan motilitas dan membran plasma utuh (Saili *et al.*, 2000; Afiati, 2004).

Sexing memerlukan pengencer yang mampu melindungi dan menyediakan lingkungan yang optimal bagi spermatozoa, agar kualitas spermatozoa hasil *sexing* dapat dipertahankan (Susilawati *et al.*, 2002). Andromed merupakan pengencer untuk semen beku dan cair. Andromed mengandung lesitin nabati yang berfungsi melindungi membran plasma spermatozoa (Aires *et al.*, 2003). Pengencer *cauda epididymal plasma-2 (CEP-2)*

memiliki komposisi mirip dengan cairan kauda epididimis sapi (Verberckmoes *et al.*, 2005). Kuning telur 10% yang ditambahkan dalam CEP-2 berperan menyediakan sumber energi, melindungi, dan mempertahankan integritas membran spermatozoa. Kuning telur membantu mencegah hipermotilitas dan kapasitas dini spermatozoa (Susilawati, 2002). Bahan-bahan yang terkandung dalam andromed dan CEP-2 diharapkan dapat melindungi membran plasma spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa setelah *sexing* dapat dipertahankan tetap baik.

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh *sexing* dengan albumin putih telur menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% terhadap kualitas spermatozoa. Kualitas spermatozoa yang diamati meliputi motilitas, viabilitas, konsentrasi, dan total spermatozoa motil.

MATERI DAN METODE

Sampel semen yang digunakan berasal dari sapi Limousin yang dipelihara di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, Malang. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas individu 70% dan motilitas massa ++. Pengencer andromed (SIGMA) dibuat dengan cara menambahkan andromed dengan akuabides dengan perbandingan 1:4. Penambahan

pengencer CEP-2 dengan kuning telur 10% dilakukan sesuai petunjuk Verberckmoes *et al.* (2005).

Gradien albumin dibuat dengan cara mencampur putih telur dengan andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10%, menghasilkan konsentrasi putih telur 10, 30, dan 50%. Gradien disusun mulai dari konsentrasi putih telur 50, 30, dan 10% dengan volume masing-masing 1,5 ml. Semen diencerkan dengan andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% (1:1), kemudian diambil 1 ml untuk dimasukkan ke dalam gradien dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pencucian dengan cara mengambil 1 ml semen pada lapisan atas dan lapisan bawah, masing-masing dimasukkan ke dalam 3 ml pengencer andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang 2 ml (Susilawati, 2003), kemudian dilakukan pengamatan kualitas spermatozoa.

Analisis Data

Data yang berbentuk persentase ditransformasi akar kuadrat. Analisis data menggunakan uji t berpasangan (Sastrosupadi, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Rataan kualitas semen segar hasil penelitian disajikan pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan makroskopis semen segar menunjukkan pH $7\pm 0,00$ dengan warna putih kekuningan. Menurut Garner dan Hafez (2008) rata-rata pH semen yang normal adalah 6,4-7,8 dengan warna putih kekuningan.

Tabel 1. Rata-rata kualitas semen segar

Parameter	Rerata \pm SD
pH	$7\pm 0,00$
Warna	Putih kekuningan
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	$70\pm 0,00$
Viabilitas (%)	$95,12\pm 1,42$
Abnormalitas (%)	$5,28\pm 3,46$
Konsentrasi (10^6 /ml)	$1432,50\pm 450,80$
Total spermatozoa motil (10^6 /ml)	$1106,88\pm 390,56$

Hasil pemeriksaan mikroskopis menunjukkan motilitas massa ++ dan motilitas individu $70\pm 0,00\%$, dan viabilitas spermatozoa $95,12\pm 1,42\%$. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini termasuk dalam kisaran normal. Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Rahmah (2007) yang melaporkan motilitas massa ++, motilitas individu 71,75%, dan viabilitas spermatozoa $93,5\pm 2,1\%$. Abnormalitas spermatozoa semen segar sebesar $5,28\pm 3,46\%$. Nilai tersebut tergolong rendah karena kurang dari 20% (Hafez dan Hafez, 2000). Konsentrasi spermatozoa semen segar adalah $1432,50\pm 450,80$ 10^6 /ml. Menurut Garner dan Hafez (2008) konsentrasi spermatozoa sapi adalah 800×10^6 - 2000×10^6 /ml. Dengan demikian dapat

dinyatakan bahwa kualitas semen segar yang digunakan sebagai materi penelitian adalah baik.

Kualitas Spermatozoa Hasil Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan motilitas spermatozoa pada lapisan atas (diduga spermatozoa X) $63\pm 2,58\%$ lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% yaitu $57\pm 4,83\%$. Pengencer andromed menghasilkan motilitas spermatozoa pada lapisan bawah $53,5\pm 3,37\%$ (diduga spermatozoa Y) sama seperti ($P>0,05$) pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% yaitu $55\pm 7,07\%$ seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Hasil penelitian Susilawati (2002), *sexing* dengan albumin putih telur menggunakan pengencer *tris aminomethan* kuning telur menghasilkan motilitas spermatozoa 50,5% pada lapisan atas dan 41% pada lapisan bawah. Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan motilitas spermatozoa hasil *sexing* lebih tinggi dibandingkan pengencer *tris aminomethan* kuning telur, sehingga dapat dikatakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu mengurangi penurunan motilitas spermatozoa. Fruktosa dan asam sitrat yang terkandung dalam pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berperan sebagai sumber energi (Simmet, 2005; Verberckmoes *et al.*, 2005), sehingga spermatozoa memiliki energi yang cukup untuk bergerak dan mampu menormalkan kondisi fisiologisnya dalam menembus medium albumin. Pengencer andromed dan CEP-2 mempunyai osmolaritas masing-masing sebesar 330 dan 320 mOsm (Minitub, 2001; Verberckmoes *et al.*, 2005).

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan viabilitas spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah masing-masing adalah $91,91\pm 3,88$ dan $92,12\pm 1,78\%$. Kondisi ini sama seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah yakni masing-masing adalah $93,3\pm 4,03$ dan $92,9\pm 2,04\%$. Dengan demikian pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu mengurangi penurunan viabilitas spermatozoa hasil *sexing*. Herdis *et al.* (2008) menyatakan, pengencer andromed mengandung lesitin nabati sebanyak 6,76 g/100 ml dan fruktosa yang berperan sebagai sumber energi sehingga spermatozoa dapat hidup dalam kondisi normal. Pengencer CEP-2 mengandung sorbitol yang berperan meningkatkan osmolaritas pengencer dan sebagai energi cadangan bagi spermatozoa pada kondisi aerob (Verberckmoes *et al.*, 2005). Makromolekul *bovine serum albumin* (BSA) dan kuning telur yang terkandung di dalam pengencer CEP-2 berperan melindungi dan mempertahankan permeabilitas dan integritas selubung lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002; Yamashiro *et al.*, 2006).

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan abnormalitas spermatozoa pada lapisan

Tabel 2. Kualitas spermatozoa setelah *sexing* menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10%

Parameter	Andromed		CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
	Lapisan atas	Lapisan bawah	Lapisan atas	Lapisan bawah
Motilitas (%)	63±2,58	53,5±3,37	57±4,83	55±7,07
Viabilitas (%)	91,91±3,88	92,12±1,78	93,3±4,03	92,9±2,04
Abnormalitas (%)	8,16±3,72	7,94±3,60	6,82±3,74	8,76±4,26
Konsentrasi (10 ⁶ /ml)	626±204,52	568±158,38	732±241,15	527±141,27
Total spermatozoa motil (10 ⁶ /ml)	197,95±68,05	151,35±39,29	209,08±73,08	144,68±40,62

atas dan lapisan bawah masing-masing sebesar 8,16±3,72 dan 7,94±3,60% sedangkan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah masing-masing sebesar 6,82±3,74 dan 8,76±4,26%. Hal ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan abnormalitas spermatozoa hasil *sexing* sama seperti pengencer *tris aminomethan* kuning telur. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa selama proses *sexing* sehingga dapat meminimalkan abnormalitas spermatozoa. Andromed mengandung lesitin nabati dari kacang kedelai (Aires *et al.*, 2003), sedangkan kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein (Aku *et al.*, 2007). Lesitin dan lipoprotein di dalam kuning telur memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran sel spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002).

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas yang relatif sama dengan lapisan bawah yakni masing-masing sebesar 626±204,52 (10⁶/ml) dan 568±158,38 (10⁶/ml), sedangkan *sexing* menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah masing-masing sebesar 732±241,15 (10⁶/ml) dan 527±141,27 (10⁶/ml). Keadaan ini diduga karena perbedaan motilitas antara spermatozoa X dan Y, tingginya volume gradien (Udrayana, 2009) dan perbedaan konsentrasi albumin (putih telur) (Susilawati, 2002) sehingga menyebabkan ketidakmerataan distribusi spermatozoa. Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Sianturi *et al.* (2004), *sexing* menggunakan pengencer *tris sitrat bufer* ditambah kuning telur menghasilkan konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah masing-masing sebesar 640,5±331,2 (10⁶/ml) dan 522,2±312,9 (10⁶/ml). Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan konsentrasi spermatozoa hasil *sexing* sama seperti pengencer *tris sitrat bufer* ditambah kuning telur. Hal ini diduga karena fruktosa yang terkandung dalam pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% (Simmet, 2005; Verberckmoes *et al.*, 2005) mampu memberikan energi bagi spermatozoa untuk menembus gradien albumin (putih telur). Spermatozoa yang memiliki motilitas tinggi juga memiliki kemampuan

memisah lebih besar dalam menembus medium albumin, sehingga menghasilkan spermatozoa dengan konsentrasi yang tinggi (Susilawati, 2002).

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan total spermatozoa motil pada lapisan atas yang relatif sama dengan lapisan bawah yakni masing-masing sebesar 197,95±68,05 (10⁶/ml) dan 151,35±39,29 (10⁶/ml) sedangkan *sexing* menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan total spermatozoa motil pada lapisan atas yang lebih tinggi dibandingkan lapisan bawah yakni masing-masing sebesar 209,08±73,08 (10⁶/ml) dan 144,68±40,62 (10⁶/ml). Data ini sesuai dengan tingginya konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas dibandingkan dengan lapisan bawah. Konsentrasi spermatozoa pada setiap lapisan merupakan faktor yang berpengaruh terhadap jumlah total spermatozoa karena konsentrasi akan berpengaruh secara langsung terhadap perhitungan total spermatozoa motil (Udrayana, 2009). Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan motilitas dan konsentrasi spermatozoa yang lebih besar dari Standar Nasional Indonesia (SNI), yaitu meliputi motilitas 40% dan konsentrasi 25 (10⁶/ml) sehingga pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan total spermatozoa motil dalam jumlah yang banyak.

KESIMPULAN

Pengencer andromed menghasilkan viabilitas, abnormalitas, konsentrasi, dan total spermatozoa motil yang sama seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mengurangi penurunan kualitas spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati, F. 2004. Proporsi dan karakteristik spermatozoa X dan Y hasil separasi kolom albumin. **Jurnal Media Peternakan** 27(1):16-20.
- Aires, V.A., K.D. Hinsch, F.M. Schloesser, F.M. Schloesser, K. Bogner, S.M. Schloesser, and E. Hinsch. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology** 60(2):269-279.
- Aku, A.S., N. Sandiah, dan P.D. Sadsoeitoeboen. 2007. Manfaat lesitin nabati pada preservasi dan kriopreservasi semen: Suatu kajian pustaka. **J. Anim. Product**. 9(1):49-52.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. In **Reproduction in Farm Animals**. 7th ed. Lippincott Williams and Wikins, Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa. In **Reproduction in Farm Animal**. 6th ed. Lippincott Williams and Wikins, Philadelphia.

- Herdis, M. Surachman, Yulnawati, M. Rizal, dan H. Maheshwari. 2008. Viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan maltosa dalam pengencer andromed[®]. **J. Indon. Trop. Anim. Agric.** 33(2):101-106.
- Minitub. 2001. **Certificate Andromed**. Minitub Abfullund Labortechnik GmbH & Co KG, Germany.
- Rahmah, Z. 2007. Perubahan Integritas Membran Spermatozoa pada Proses *Sexing* dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. **Tesis**. Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengelahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang.
- Saili, T., M.R. Toelihere, A. Boediono, dan B. Tappa. 2000. Keefektifan albumin sebagai media pemisah spermatozoa sapi pembawa kromosom X dan Y. **Jurnal Hayati**. 7(4):106-109.
- Sastrosupadi, A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian**. Kanisus, Yogyakarta.
- Sianturi, R.G., P. Situmorang, E. Triwulanningsih, dan D.A. Kusumaningrum. 2007. Pengaruh Penambahan Glutathione dan Kolesterol pada Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Metode Kolom Albumin Telur. **Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Semarang**: 207-213.
- Sianturi, R.G., P. Situmorang, E. Triwulanningsih, T. Sugiarti, dan D.A. Kusumaningrum. 2004. Pengaruh isobutil metilxantina (IMX) dan waktu pemisahan terhadap kualitas dan efektivitas pemisahan spermatozoa dengan metode kolom albumin telur. **JITV**. 9(4):246-251.
- Simmet, M.V.C. 2005. **Bovine Artificial Insemination**. Minitub Abfu-und Labortechnik. GmbH & Co KG, Germany.
- Susilawati, T. 2002. *Sexing* spermatozoa kambing peranakan Etawah menggunakan gradien putih telur. **Widya Agrika**. 10(2):97-105.
- Susilawati, T. 2003. Tingkat keberhasilan inseminasi buatan pada sapi peranakan Ongole menggunakan semen beku hasil *sexing* dengan gradien konsentrasi putih telur. **JIIP**. 20:1431-1438.
- Susilawati, T., Hermanto, P. Sianto, dan E. Yuliani. 2002. Pemisahan spermatozoa X dan Y pada sapi brahman menggunakan gradien putih telur pada pengencer tris dan tris kuning telur. **Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati** 14(2):176-181.
- Udrayana, S.B. 2009. Proteksi Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Fosfatidil dalam Proses *Sexing* dengan Gradien BSA dan Pembekuan. **Disertasi**. Pogram Studi Doktor Ilmu Peternakan Program Pascasarjana Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang.
- Verberckmoes, S., A. Van Soom, J. Dewulf, and A. de Kruif. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology** 63(3):912-922.
- Yamashiro, H., H. Wang, Y. Yamashita, K. Kumamoto, and T. Terada. 2006. Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). **J. Reproduct. Developm.** 52(3):407-414.